ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. II No 2–3

1 9 5 3

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
24 DEC 1953

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej oraz referaty przeglądowe nigdzie dotychczas nie opublikowane. „Przegląd Literatury" przyjmuje streszczenia z prac obcojęzycznych.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS, Lublin, ul. Stalinogradzka 85.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie oraz angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski, niemiecki) mogą być nadsyłane po uprzednim porozumieniu się z redakcją; należy do nich dołączyć streszczenie polskie i rosyjskie lub polskie i angielskie (francuskie, niemieckie). Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku publikacji oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora(ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania; c) wyniki, d/ dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne (nie dłuższe niż 15% tekstu).

Prace należy ujmować treściwie; wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko; tam, gdzie to możliwe, powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze i istotne wyniki. Rysunki i wykresy należy sporządzać w dwukrotnym powiększeniu, tuszem na bristolu bez połysku — każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem:tytuł pracy, nazwisko autora oraz nr rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem nr rysunku i wykresu. W objaśnieniach należy podawać powiększenie. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia) oraz dołączyć wykaz tablic i rysunków z podaniem numeracji i miejsca w tekście.

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podawać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Cienkowski (18..) lub (Cienkowski, 18..). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nr porządkowy, nazwisko i inicjały autora(ów), kropka, rok, kropka, tytuł pracy, nazwę czasopisma w przyjętych skrótach, tom, ewentualnie zeszyt, stronicę czasopisma; w wypadku zaś cytowania książki: nr porządkowy, nazwisko i inicjały autora(ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i firmę wydawcy, ewentualnie stronicę tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml a nie ccm, g — a nie gr, 100° — a nie 100°C, M-molarny, N-normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżniać „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu, „stężenie %" — g na 100 ml roztworu.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich.

W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie; o dodatkowe odbitki autor może zwrócić się do redakcji przy składaniu maszynopisu.

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. II No 2–3

1953
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek-korespondent PAN — Lublin

Kazimierz Bassalik, członek tytularny PAN — Warszawa, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwika Jakubowska — Łódź, Adolf Joszt — Gliwice, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Lublin, Eugeniusz Pijanowski — członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa.

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger. Sekretarz Redakcji — Kazimierz Dygdała.

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1953

Nakład 975 + 25 ndb.	*Zamówienie 402c/53*
Arkuszy wyd. 13 — Druk. — $10^1/_8$	*Druk ukończono 25. VIII. 53*
Papier druk. sat. V, 60 g, 70× 100/16	*4-B-19114 Cena zł. 20 —*

DRUKARNIA IM REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ — WARSZAWA

PRACE XII ZJAZDU MIKROBIOLOGÓW POLSKICH

Sekcja B (Mikrobiologia ogólna, rolnicza i przemysłowa)
dnia 8, 9 i 10 listopada 1952 r. w Łodzi

ТРУДЫ XII СЪЕЗДА ПОЛЬСКОГО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА

Секция „B" (общая, сельско-хозяйственная и техническая микробиология), 8 — 10 ноября 1952 г. в Лодзи

PROCEEDING OF POLISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Section B: General, Agricultural and Industrial Microbiology
Twelfh Annual General Meeting on the 8th, 9th and 10th November 1952 at Łódź

Prace i doniesienia zostały zamieszczone zasadniczo w takiej formie, w jakiej otrzymał je Komitet Organizacyjny Sekcji B Zjazdu i Komitet Redakcyjny.

Z powodu dużej ilości materiału „Przegląd literatury" zostanie zamieszczony dopiero w następnym numerze.

WNIOSKI SEKCJI B XII ZJAZDU MIKROBIOLOGÓW POLSKICH ZGŁOSZONE NA PLENUM ZJAZDU

A. Wnioski dotyczące wszystkich Sekcji Zjazdu (organizacyjne)

1. Zjazdy ogólne powinny się odbywać nie częściej niż raz na 3 lata. Zjazdy te powinny łączyć wszystkich specjalistów i rozpatrywać problemy szczególnie ważne, wymagające różnorodnego naświetlenia. Doniesienia szczegółowe należy skreślić z porządku obrad zjazdów ogólnych. Powinny one być tematem specjalnie w tym celu zwoływanych raz na rok konferencji, grupujących mikrobiologów danej specjalności.

2. Proponujemy, aby jednym z tematów głównych następnego Zjazdu Ogólnego P.T.M. było zagadnienie mikrobiologii środowiskowej. Proponujemy, aby na tym Zjeździe tematem głównym dla Sekcji *B* było zagadnienie mikrobiologii wody.

B. Wnioski tematyczne

I. Opracowanie na następny Zjazd Ogólny polskiej bibliografii mikrobiologicznej za lata 1945 — 1954.

Proponujemy powołanie dla Sekcji *B* Komitetu Redakcyjnego w składzie:
prof. Wł. Kunicki-Goldfinger — mikrobiologia ogólna,
prof. J. Ziemięcka i dr J. Strzemska — mikrobiologia gleby,
prof. J. Jakubowska i prof. E. Nowotny — mikrobiologia przemysłowa.

II. W zakresie poszczególnych działów mikrobiologii:

a) *Mikrobiologia ogólna*

Stwierdzamy konieczność otoczenia szczególną opieką przez PAN badań podstawowych z zakresu mikrobiologii ogólnej, na której opierają się wszystkie dziedziny mikrobiologii stosowanej.

b) *Mikrobiologia gleby*

Uznajemy za bardzo potrzebny dalszy rozwój prac nad szczepionkami dla roślin motylkowych i innych oraz nad mykoryzą. Zwracamy się do PAN i Ministerstwa Rolnictwa w sprawie przyśpieszenia organizacji produkcji szczepionek.

c) *Mikrobiologia przemysłowa*

Stwierdzamy konieczność:

1) zaplanowania przez PAN i Instytut Gospodarki Komunalnej systematycznych badań dotyczących spraw wody i ścieków. Wiąże się to z szerokim planem uporządkowania gospodarki wodnej naszego kraju;

2) rozpoczęcia systematycznych badań nad biologiczną odpornością tworzyw pochodzenia organicznego, narażonych na zniszczenie lub uszkodzenie w zetknięciu z mikroflorą otoczenia, poparcia placówek naukowych pracujących w tym kierunku oraz objęcia ich prac planem ogólnym;

3) prowadzenia prac nad selekcją szczepów drobnoustrojów mających znaczenie gospodarcze;

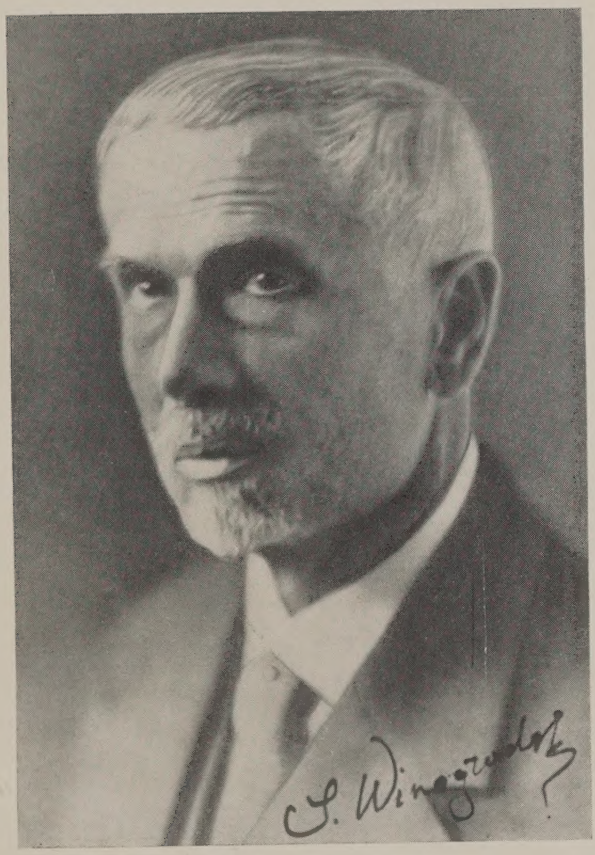
4) ścisłej i stałej współpracy przemysłu z placówkami badawczymi i uregulowania tej sprawy poprzez resortowe Ministerstwa i Centralne Zarządy.

d) *Metodyka badań mikrobiologicznych*

Sekcja stwierdza, iż zadaniem podstawowym jest opracowanie i znormalizowanie metod badań i kontroli w zakresie:

1) analiz wody i wód ściekowych, mleka i innych środków spożywczych;

2) wpływu wszelkich zabiegów konserwujących w przemyśle spożywczym i budowlanym, których skuteczność stosowania musi być oparta na odpowiednio opracowanych instrukcjach przeprowadzania technicznego poszczególnych zabiegów.



Sergiusz Winogradski
1. IX. 1856 – 24. II. 1953

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

J. Ziemięcka

SERGIUSZ WINOGRADSKI

(Kijów 1. IX. 1856—Brie-Comte-Robert 24. II. 1953)

W lutym 1953 roku zmarł w 97 roku życia jeden z największych bakteriologów naszej epoki — profesor Sergiusz Winogradski.

Urodzony w Kijowie pobierał tam Winogradski nauki średnie i rozpoczął studia uniwersyteckie, po czym przeniósł się do uniwersytetu petersburskiego, gdzie ukończył studia przyrodnicze pod kierunkiem uczonych tej miary, co Mendelejew, Famincin i inni. Mając gruntowne przygotowanie z zakresu analityki chemicznej, botaniki i nauk fizjologicznych, poświęca się Winogradski mikrobiologii, obierając za główny przedmiot swych studiów bakterie środowisk naturalnych — gleby i wody. Kierunkowi temu pozostaje wierny w ciągu całej swej, trwającej niemal 60 lat, pracy naukowej.

Wyjeżdżając w roku 1885 do pracowni De Bary'ego w Strassburgu poświęca się tam Winogradski opracowaniu morfologii i fizjologii bakterii siarkowych i żelazistych. Zakłada pomysłowe w swej metodycznej prostocie mikrohodowle, śledzi w nich cykle rozwojowe tych organizmów i wyosobnia wśród nich wiele gatunków.

Uzbrojony w udokumentowane wyniki swych badań, zabiera głos w toczącej się polemice między monomorfistami i pleomorfistami, wykazując, że u podłoża ówczesnej teorii pleomorfizmu (Nägeli, Zopf i inni) leżał przede wszystkim brak metod badawczych, a więc możliwości systematycznych studiów nad rozwojem drobnoustrojów i nad ich zmiennością.

Zainteresowany niezwykłym sposobem bytowania bakterii siarkowych i żelazistych odkrywa w nich Winogradski nieznaną dotychczas grupę fizjologiczną — bakterii autotroficznych, które nazywa też anorgoksydantami. Wkrótce też dołączy do tej grupy odkryte przez siebie bakterie nitryfikacyjne. Dzięki tym odkryciom zdobywa światową sławę i liczne odznaczenia, z których najmilsze młodemu uczonemu było otrzymane od Pasteura zaproszenie do podjęcia współpracy w instytucie założonym przez tego Mistrza. Skorzystał z tego Winogradski jednak dopiero u schyłku swego życia.

Dzięki opracowanym przez siebie metodom hodowli elektywnych uzyskuje Winogradski podstawowe wiadomości o własnościach fizjologicznych bakterii nitryfikacyjnych, opisuje ich rodzaje i gatunki, określa ich rolę w przemianach azotu w przyrodzie. Większość tych prac wykonuje w Zurychu, skąd po kilkulet-

nim pobycie powraca do Petersburga, gdzie współpracuje z ukochanym swoim uczniem — prof. Omeliańskim.

W tym czasie, na przełomie wieku XIX i XX, odkrywa Winogradski niesymbiotyczne bakterie wiążące wolny azot i stwierdza ich olbrzymie znaczenie w przyrodzie.

Po dłuższej przerwie powraca do pracy mikrobiologicznej w roku 1922, osiedlając się w założonej dla niego filii Instytutu Pasteura w Brie-Comte-Robert pod Paryżem.

Pracę swą rozpoczyna teraz od zanalizowania sytuacji w mikrobiologii rolniczej, a ściślej mówiąc w mikrobiologii gleby. Stwierdza, że w przeciwieństwie do innych stosowanych nauk mikrobiologicznych omawiana tu nauka ogranicza się do wyławiania z gleby różnych drobnoustrojów i do badania ich za pomocą klasycznych metod mikrobiologii ogólnej, nie troszcząc się wcale o poznanie rozwoju i roli tych drobnoustrojów w ich środowisku naturalnym. Chcąc rozwinąć mikrobiologię ekologiczną należy przede wszystkim opracować odpowiednią do tego celu metodykę. Znowu więc stwarza Winogradski nową metodę, znaną pod nazwą metody bezpośredniej. Przypominamy, że metoda ta umożliwia badanie drobnoustrojów w samej glebie lub w środowisku do niej zbliżonym.

Za pomocą tej metody opracowuje Winogradski występowanie i rozwój w glebach i wodach grupy tlenowych asymilatorów wolnego azotu oraz bakterie rozkładające różne substancje organiczne w glebie, zwłaszcza bakterie błonnikowe. We współpracy ze swą córką Heleną wznawia też i rozszerza badania nad nitryfikatorami. Odkrywa i opisuje liczne gatunki bakterii, a przede wszystkim wykazuje w licznych doświadczeniach, jak silnie wpływają zmienne warunki środowiska na stan zespołów drobnoustrojów w glebie i jak dalece zależy od nich dynamika rozwojowa poszczególnych grup fizjologicznych.

Te i inne, zaledwie naszkicowane tutaj osiągnięcia sprawiają, że uważamy dzisiaj Winogradskiego za twórcę mikrobiologii glebowej.

Podczas drugiej wojny światowej zebrał Winogradski prawie wszystkie swoje prace w olbrzymim wydawnictwie, które ukazało się w r. 1949 pt. „Microbiologie du sol — Problèmes et Méthodes, 50 ans de recherches". Poszczególne zagadnienia omawia też w tym dziele na tle stanu współczesnych jego badaniom poglądów i osiągnięć innych uczonych. W przedmowie pisze, że największą zachętą do tej wielkiej pracy była dla niego świadomość, że będzie mógł pokazać młodym badaczom, jak wygląda długa droga życia uczonego, pełna nie tylko triumfów, ale i wielu trudności, a nawet rozczarowań.

Przetłumaczona już na język rosyjski praca ta wkrótce ma się ukazać również w języku polskim.

Wraz z paru jego uczniami, do których miałam zaszczyt należeć, próbowaliśmy nieraz scharakteryzować naszego Mistrza jako uczonego i jako człowieka. Sądziliśmy zgodnie, że obdarzony niezwykłym krytycyzmem a zarazem intuicją należał Winogradski do tych uczonych, którzy każde z obranych przez siebie zagadnień badają od podstaw i we wnioskach swoich zawsze trafiają w sedno spraw najważniejszych. Ten znakomity eksperymentator i bystry obserwator zjawisk przyrodniczych był obok tego wybitnym muzykiem, miłośnikiem gór i wszelkich przejawów piękna. Pasja badacza łączyła się w tym uczonym — artyście z umiłowaniem formy, czego odzwierciedlenie znajdujemy w jego pięknie, jasno i żywo pisanych publikacjach.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

O. Sakławska-Szymonowa

WPŁYW MIEDZI NA WZROST I ZUŻYTKOWANIE GLUKOZY W PŁYNNYCH HODOWLACH *ESCHERICHIA COLI**

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie

Rola miedzi w przemianach bakteryjnych nie została jeszcze dokładnie wyjaśniona. W systematyce pierwiastków o znaczeniu biologicznym (C a l v e r y 1942, T h a t c h e r 1943) jony miedzi podobnie jak manganu, żelaza, kobaltu i innych metali zostały zaliczone do czynników biorących udział w procesach oksydoredukcyjnych.

Działanie miedzi na drobnoustroje może być wielorakie. Dla szeregu bakterii, jak np. *Rhizobium*, *Azotobacter chroococcum*, *Vibrio thyrosinatica*, *Actinomyces*, oraz grzybów — *Aspergillus niger*, jony miedzi w stężeniach śladowych są aktywatorami wzrostu, zarodnikowania i produkcji barwików (P o r t e r 1947). E l v e h j e m (1931) stwierdził pobudzający wpływ miedzi również na wzrost fermentujących drożdży. Zakres stężeń miedzi działających toksycznie jest bardzo szeroki i swoiście zależy od typu drobnoustroju. Dla bakterii z grupy *Serratia* i dla glonów stwierdzono toksyczność miedzi już w minimalnych ilościach (*Serratia* 1 : 100.000 $CuCl_2$, *Spirogyra* 1 : 25.000.000 $CuSO_4$ — P o r t e r 1947). Natomiast dla niektórych gatunków grzybów — *Torula* i *Penicillium* a także dla *Staphylococcus aureus* stwierdzono znaczną tolerancję na większe stężenia miedzi (*Torula* i *Penicillium* — 10 — 14% $CuSO_4$, P o r t e r 1947). Oligodynamiczne działanie jonów miedzi badano u wielu drobnoustrojów, między innymi i u *Escherichia coli* (S e u d e r l i n g, 1932). T a m m a n n i R i e n ä c k e r (1928) wykazali, że *E. coli* i *Corynebacterium diphteriae* są znacznie mniej wrażliwe na toksyczne działanie miedzi niż inne drobnoustroje. O p i e ń s k a - B l a u t h, K a ń s k i i S t o b i ń s k a (1949) w doświadczeniach prowadzonych na płynnych hodowlach *E. coli* stwierdzili normalny wzrost masy bakteryjnej przy równoczesnym zahamowaniu przemiany węglowodanowej pod wpływem nieznacznych stężeń jonów miedzi.

Tematem obecnej pracy było zbadanie wpływu różnych stężeń miedzi na wzrost i przemianę węglowodanową *E. coli* oraz próby wyjaśnienia mechanizmu toksycznego działania miedzi na drodze reaktywacji zablokowanych układów enzymatycznych.

---

* Praca niniejsza była subwencjonowana przez Sekcję Naukową Państwowej Komisji Popierania Twórczości Naukowej i Artystycznej przy Prezydium Rady Ministrów.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

A. MATERIAŁ DOŚWIADCZALNY I METODYKA BADAŃ

1. Drobnoustrój

Do badań używano 24-godzinnej hodowli *Escherichia coli*[1] na agarze skośnym, z której sporządzano zawiesinę o gęstości 20 oczek standardowej ezy platynowej w 10 ml jałowego fizjologicznego roztworu soli kuchennej.

2. Podłoże

Zawiesinę rozlewano w ilości 0,5 ml do 10 ml syntetycznego podłoża płynnego wg Kosera. Podłoże sterylizowano trzykrotnie w aparacie Kocha.

3. Inkubacja

Inkubację prowadzono w kolbkach, zawierających po 10 ml pożywki, w temp. 37° przez czas od 0 — 72 godzin. Po 0, 6, 12, 24, 48 i 72 godzinnej inkubacji zabijano bakterie przez 15-minutowe ogrzewanie na wrzącej łaźni wodnej.

4. Oznaczenia

a) Przyrost masy bakteryjnej oznaczano nefelometrycznie wg skali Mc Farlanda.

b) pH podłoża określano przy pomocy autojonometru firmy „Radiometer".

c) Zużycie glukozy określano metodą chromatografii bibułowej, stosując bibułę Whatman nr 1, układ rozpuszczalników: butanol, pirydyna, woda w stosunku 9 : 5 : 8 (Opieńska-Blauth, Madecka-Borkowska, 1951) oraz test wywołujący z azotanem srebrowym, zmodyfikowany (Trewelyan, Proctor i Harrison, 1950). Na podstawie wielkości plam oraz natężenia ich zabarwienia oceniano w przybliżeniu ilościowy ubytek glukozy w podłożu.

Wszystkie opisane poniżej doświadczenia, dotyczące zarówno wpływu miedzi na wzrost i zużytkowanie glukozy u *E. coli*, jak i reaktywacji zablokowanych miedzią układów enzymatycznych, przeprowadzono w 3- — 5-krotnych powtórzeniach uzyskując każdorazowo zgodne wyniki.

Na wykresach i fotografiach chromatogramów przedstawione zostały przykładowo wyniki jednego z doświadczeń.

B. OPIS WYKONANYCH DOŚWIADCZEŃ

Seria I

Wpływ różnych stężeń miedzi na wzrost bakterii i zużycie glukozy

Do poszczególnych kolbek z pożywką Kosera dodawano bezpośrednio przed posiewem różne ilości wyjałowionego roztworu siarczanu miedziowego.

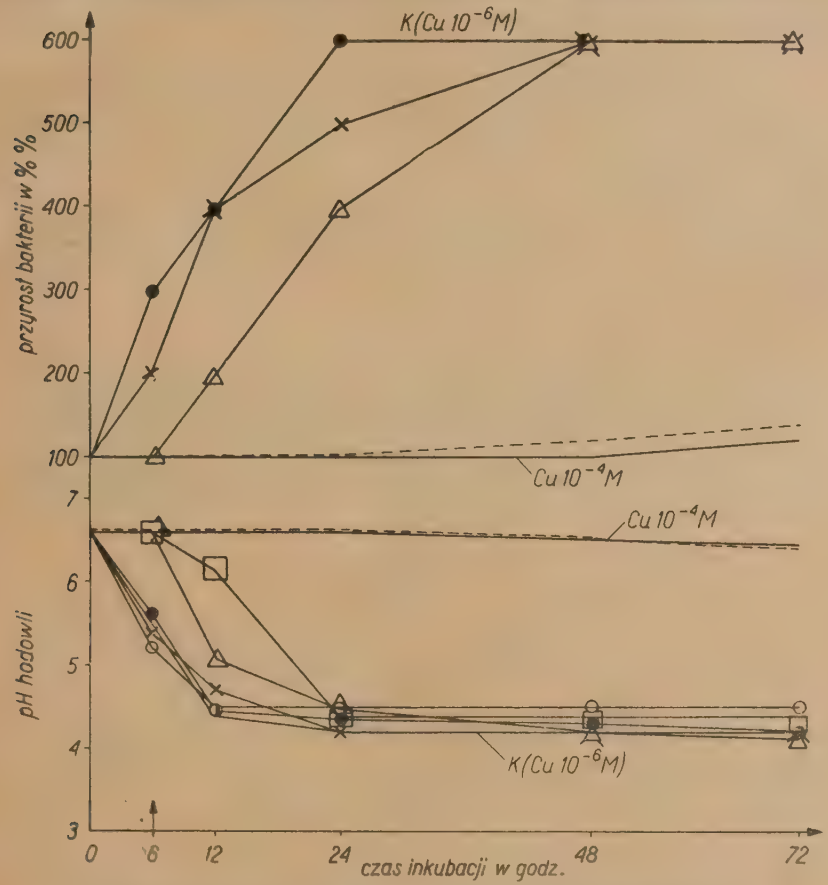
Miedź w stężeniu 10^{-4}M powoduje całkowite zahamowanie przyrostu masy bakteryjnej, spadku pH i zużycia glukozy. W stężeniu dziesięciokrotnie niższym (10^{-5}M) zaznacza się wyraźne zwolnienie znikania glukozy z podłoża oraz w mniejszym stopniu zwolnienie spadku pH i przyrostu masy bakteryjnej. Natomiast miedź w stężeniu 10^{-6}M nie wpływa hamująco ani na wzrost, ani na zakwaszenie podłoża, ale opóźnia proces glikolizy (Wykres 1, Tabl. I).

Niższe stężenia miedzi nie wywierają dostrzegalnego wpływu na procesy wzrostu, zużycia glukozy i spadek pH.

---

1 Szczep *E. coli* otrzymano z Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Lublinie.

W stężeniu 10 $^{-3}$M i 10-^{2}M miedzi następuje całkowite zahamowanie glikolizy i spadku pH. Przyrostu masy bakteryjnej w tych wypadkach nie oznaczano, ponieważ zmętnienie powstające przy



Wykres 1. Przyrost ilości bakterii i zmiany pH w płynnej hodowli *E. coli*

Рис. 1. Прирост количества бактерий и изменения pH в жидкой культуре *E. coli*

Fig. 1. Changes in the turbidity and pH of culture of *E. coli* during growth in Koser medium and in Koser medium with:

— O — hodowla + Cu 10^{-4}M + cysteina 5 × 10^{-4} M dodana równocześnie
— △ — „ „ Cu 10^{-4} M + cysteina 5 × 10^{-4} M dodana po 6 godzinach
— — — „ „ BAL (Dwutiopropanol) 10 mg %
— X — „ „ Cu 10^{-4} M + BAL 10 mg % dodany równocześnie
— ● — „ „ Cu 10^{-4} M + BAL 10 mg % dodany po 6 godzinach

wytrącaniu się fosforanu miedzi uniemożliwiało dokonanie pomiaru wzrostu metodą nefelometryczną. Równoległe doświadczenia z chlorkiem miedziawym dały wyniki takie same jak z jonami miedziowymi.

We wszystkich doświadczeniach przeprowadzane były próby kontrolne na pożywce nie zawierającej miedzi oraz zawierającej zamiast siarczanu miedziowego siarczan sodowy. W tym ostatnim przypadku nie zaobserwowano żadnego wpływu jonu SO''_4 w użytych stężeniach na wzrost i przemianę węglowodanową.

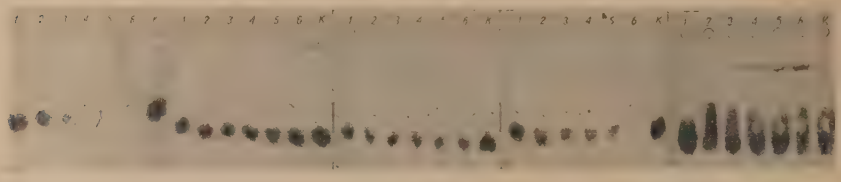
W celu całkowitego usunięcia miedzi z podłoża zastosowano 8-oksychinolinę, która tworzy związki kompleksowe z ciężkimi metalami. 8-oksychinolina dodana do pożywki w stężeniu 10^{-3}M spowodowała zahamowanie wzrostu bakterii, spadku pH i glikolizy. Na chromatogramie stwierdzono występowanie prócz glukozy drugiego związku o właściwościach redukujących (Tabl. I).

Tablica I

Wpływ miedzi i 8-oksychinoliny na znikanie glukozy w płynnej hodowli *E. coli* (chromatogramy)

Влияние меди и 8-оксихинолина на исчезание глюкозы в жидкой культуре *E. coli* (Хроматограммы)

The effect of copper and of 8-oxyquinoline on the uptake of glucose in the fluid culture of *E. coli* (Chromatograms)



1 2 3 4 5

Chromatogram 1 — hodowla kontrolna
„ 2 — „ + Cu 10^{-4} M
„ 3 — „ + Cu 10^{-5} M
„ 4 — „ + Cu 10^{-6} M
„ 5 — „ + 8-oksychinolina 10^{-3} M

Seria II

Próby reaktywacji zahamowanych układów enzymatycznych

W doświadczeniach nad reaktywacją oparto się na pracy Lernera i Fitzpatricka (1950), którzy inaktywowali tyrozynazę zawierającą miedź przy pomocy związków tworzących z miedzią słabo zdysocjowane połączenia. Do reaktywacji stosowano: a) cysteinę, b) dwutiopropanol (BAL), c) dwuetylodwutiokarbaminian sodowy, d) cyjanek sodowy.

Ad a). Stosowano chlorowodorek cysteiny (uprzednio zobojętniony do pH 7) w stężeniu 5 razy większym (5×10^{-4}M) od stężenia miedzi: równocześnie z miedzią, po upływie 30 minut i po 6 godzinach działania inhibitora. We wszystkich trzech doświadczeniach nastąpiła całkowita reaktywacja (Wykres 1, Tabl. II). Sama cysteina w hodowlach kontrolnych nie wywiera dostrzegalnego wpływu na procesy wzrostu, spadek pH i znikanie glukozy.

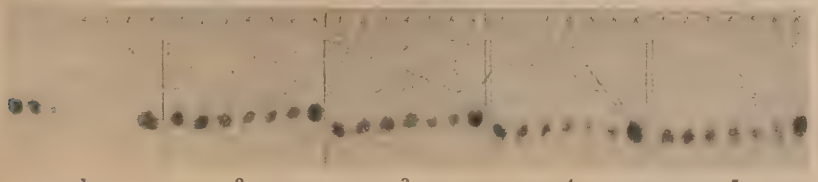
Ad b). Do reaktywacji użyto preparatu farmaceutycznego dwutiopropanolu (BAL) F-my Westcott & Dunning w ilości 10 mg %: równocześnie z miedzią, po 30 minutach i po 6 godzinach działania miedzi (Wykres 1, Tabl. II). W opisanych warunkach nastąpiła całkowita reaktywacja. Należy jednak podkreślić, że sam dwutiopropanol w zawiesinie olejowej wpływa wyraźnie hamująco zarówno na wzrost, jak i znikanie glukozy (Wykres 1, Tabl. II).

Ad c). Wodny roztwór dwuetylodwutiokarbaminianu sodowego w stężeniu 5×10^{-4}M dodany do hodowli równocześnie z inhibitorem, bądź po upływie 30 minut lub 6 godzin jego działania, powoduje całkowitą reaktywację. Wzrostu bakterii nie oznaczano z powodu

powstawania osadu kompleksowego związku miedzi z dwuetylodwutiokarbaminianem. O reaktywacji jednak może świadczyć spadek pH i znikanie glukozy, takie jak w warunkach normalnych bez udziału inhibitora (Wykres 2, Tabl. III.)

Tablica II

Wpływ cysteiny i dwutiopropanolu na zatrucie miedzią u *E. coli*
Влияние цистеина и дитиопропанола при отравлении медью *E. coli*
The effect of cysteine and of BAL in the case of copper intoxication in *E. coli* (Chromatograms)



1 2 3 4 5

Chromatogram 1 — hodowla + Cu 10^{-4} M + cysteina 5×10^{-4} M dodana równocześnie
„ 2 — „ + Cu 10^{-4} M + cysteina 5×10^{-4} M dodana po 6 godz.
„ 3 — „ + Cu 10^{-4} M + dwutiopropanol 10 mg %
„ 4 — „ + Cu 10^{-4} M + dwutiopropanol 10 mg % dodany równocześnie
„ 5 — „ + Cu 10^{-4} M + dwutiopropanol 10 mg % dodany po 6 godz.

Tablica III

Wpływ dwuetylodwutiokarbaminianu, histydyny i jonów Mo na zatrucie miedzią u *E. coli*
Влияние диэтилдитиокарбаминового натрия, гистидина и ионов Mo при отравлении медью *E. coli*
The effect of diethyldithiocarbamate, of histidine and of Mo-ions in the case of copper intoxication in *E. coli*

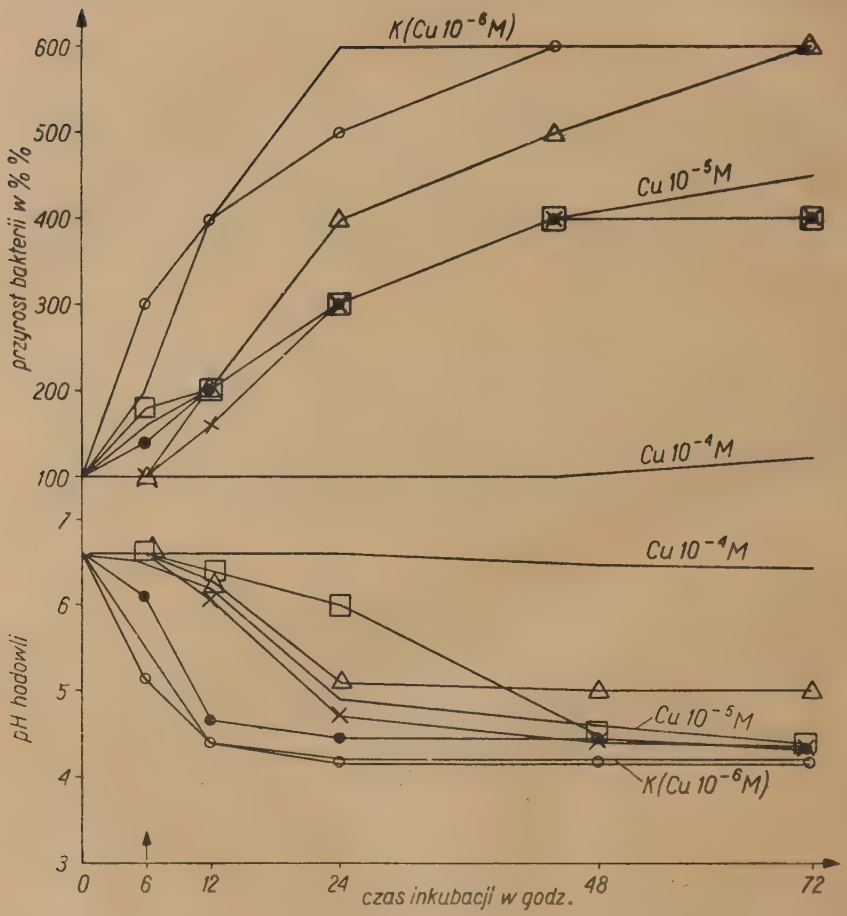
1 2 3 4 5 6

Chromatogram 1 — hodowla + Cu 10^{-4} M + dwuetylodwutiokarbaminian 5×10^{-4} M dodany równocześnie
Chromatogram 2 — hodowla + Cu 10^{-4} M + dwuetylodwutiokarbaminian 5×10^{-4} M dodany po 6 godz.
Chromatogram 3 — hodowla + Cu 10^{-4} M + histydyna 2×10^{-3} M dodana równocześnie
„ 4 — „ + Cu 10^{-4} M + histydyna 2×10^{-3} M dodana po 6 godz.
„ 5 — „ + Mo 10^{-4} M
„ 6 — „ + Mo 10^{-4} M + Cu 10^{-6} M

Ad d). Zastosowany dla celów reaktywacji cyjanek sodowy w stężeniach 10^{-3}M i $5 \cdot 10^{-4}$M nie reaktywował zarówno wzrostu, jak i przemiany węglowodanowej. W próbach kontrolnych z cyjankiem w powyższych stężeniach stwierdzono jedynie tylko opóźnienie w znikaniu glukozy bez wpływu na wzrost i zmianę pH.

Próby reaktywacji przy pomocy histydyny

Według Schadego (1949) histydyna znosi toksyczne działanie kobaltu w hodowli *Proteus vulgaris*, *E. coli* i innych bakterii. Nasuwało się pytanie, czy histydyna będzie również czyn-



Rys. 2. Przyrost ilości bakterii i zmiany pH w płynnej hodowli *E. coli*

Рис. 2. Прирост количества бактерий и изменения pH в жидкой культуре *E. coli*

Fig. 2. Changes in the turbidity and pH of culture of *E. coli* during growth in Koser medium and in Koser medium with:

O — hodowla + Cu 10^{-4} M + dwuetylodwutiokarbaminian 5×10^{-4} dodany równocześnie
△ — „ + Cu 10^{-4} M + dwuetylodwutiokarbaminian 5×10^{-4} dodany po 6 godzinach
× — „ + Cu 10^{-4} M + histydyna 2×10^{-3} M dodana równocześnie
··· — „ + Cu 10^{-4} M + histydyna 2×10^{-3} M dodana po 6 godzinach
● — „ + Mo 10^{-4} M
□ — „ + Mo 10^{-4} M + Cu 10^{-6} M

na u *E. coli* w wypadku zatruć miedzią. Chlorowodorek histydyny (doprowadzony do pH 7) w stężeniu 2×10^{-3}M dodawano do hodowli zawierającej mieszaninę równocześnie z miedzią, po 30 minutach i po 6 godzinach inkubacji w obecności miedzi. We wszystkich trzech doświadczeniach uzyskano całkowitą reaktywację zahamowanych procesów (Wykres 2, Tabl. III). Natomiast nie uzyskano reaktywacji przy pomocy histaminy (2×10^{-3}M), alaniny (5×10^{-4}M) i lizyny (5×10^{-4}M), co potwierdza wyniki doświadczeń Schadego z *Proteus vulgaris* w obecności kobaltu.

Próby reaktywacji przy pomocy 8-oksychinoliny

Według Alberta i współpracowników (1947) bakteriostatyczne działanie 8-oksychinoliny można usunąć przy pomocy niektórych ciężkich metali, tworzących z 8-oksychinoliną nierozpuszczalne związki kompleksowe (w odniesieniu do bakterii gramujemnych-jony cynku, żelaza, miedzi). W przeprowadzonych doświadczeniach 8-oksychinolina w stężeniach 8×10^{-4}M, $1,2 \cdot 10^{-4}$M, i $3,2 \times 10^{-5}$M dodana do podłoża z miedzią (10^{-4}M) nie reaktywowała wzrostu hodowli i zużycia glukozy. Jak stwierdzono w próbach kontrolnych, sama 8-oksychinolina działa jako inhibitor. Wpływ hamujący 8-oksychinoliny proporcjonalny do stężenia obejmował zarówno wzrost, jak zmianę pH i szybkość znikania glukozy. Przy najwyższym stężeniu 8-oksychinoliny pojawia się nowy, nieokreślony bliżej metabolit o własnościach redukujących.

Seria III

Działanie antagonistyczne niektórych jonów metalicznych

a) Antagonizm miedź — magnez

Abelson i Aldous (1950) stwierdzili reaktywujący wpływ dużych stężeń jonu magnezowego na hodowle *E. coli* i *Aerobacter aerogenes* zatrute jonami Ni, Co, Zn, Cd, Mn. Analogicznie do powyższych doświadczeń przeprowadzono próby reaktywowania hodowli *E. coli* zatrutych miedzią (10^{-4}M) przy pomocy znacznych stężeń siarczanu magnezowego. W warunkach przeprowadzonych doświadczeń spośród trzech zastosowanych stężeń (0,2 % 00, 2,0 % 00, 20,0 % 00) tylko to ostatnie spowodowało dostrzegalną reaktywację zużytkowania glukozy, wzrostu bakterii i spadku pH. Siarczan magnezowy dodany w tym wysokim stężeniu do podłoża nie zawierającego miedzi hamował nieznacznie wzrost masy bakteryjnej i opóźniał zużycie glukozy.

b) Antagonizm miedź — molibden

Zgodnie z poglądami Glassa (1950) molibden wprowadzony do organizmu zwierzęcego działa antagonistycznie w stosunku do enzymów zawierających miedź. W wykonanych przez nas doświadczeniach molibden (pod postacią molibdenianu sodowego) w stężeniu 10^{-4}M i 10^{-6}M dodany do hodowli z miedzią (10^{-4}M) nie reaktywował wzrostu ani glikolizy. W próbach kontrolnych z molibdenem w stężeniu 10^{-4}M zaobserwowano — analogiczne do działania miedzi — zahamowanie tak wzrostu bakterii, jak i zahamowanie glikolizy. Natomiast w hodowli zawierającej molibden w stężeniu 10^{-4}M oraz miedź w stężeniu 10^{-6}M wystąpił efekt antagonistyczny pod postacią likwidacji objawów zatrucia (Wykres 2, Tabl. III).

c) Antagonizm miedź — arsen

Nawiązując do wyników pracy Kluga, Moxona i Petersona (1950), którym udało się przy pomocy związków arsenu reaktywować dehydrogenazę kwasu bursztynowego zatrutą selenem, przeprowadzono próby wykazania antagonizmu pomiędzy arseninami i miedzią. Doświadczenia wykonano jak poprzednio, dodając do hodowli zawierającej miedź (10^{-4}M) roztwór arseninu sodowego w stężeniu 5×10^{-4}M. W przebiegu 48 godzinnej inkubacji nie stwierdzono antagonistycznego działania arseninu. Próby kontrolne zawierające arsenin bez dodatku miedzi wykazywały w porównaniu z hodowlą normalną opóźnienie glikolizy, nieznaczny spadek pH i słaby przyrost masy bakteryjnej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Mechanizm toksycznego działania miedzi na drobnoustroje nie był przedmiotem systematycznych badań.

Większość autorów wyraża pogląd, że toksyczne działanie jonów miedzi mogłoby polegać, podobnie do działania innych metali ciężkich, na blokowaniu lub utlenianiu czynnych dla szeregu enzymów grup SH. Według Naganny i Narayany Menona (1948) minimalne ilości miedzi powodują całkowite zahamowanie enzymów, których aktywność uwarunkowana jest obecnością grup SH. Najprawdopodobniej metale ciężkie tworzą z grupami SH odwracalne merkaptydy (Guzman Barron 1951). Slater (1949) na podstawie doświadczeń z oksydazą kwasu bursztynowego przypuszcza, że jony miedziowe w pierwszym momencie zadziałania utleniają grupy SH enzymu do siarczków S—S, a następnie już jako jony miedziawe tworzą z pozostałymi nieutlenionymi jeszcze grupami SH — związki typu merkaptydów.

Większość metali może również inaktywować grupy NH_2 białek.

Stwierdzone zostało również hamujące działanie jonów miedzi na przepuszczalność otoczki krwinek czerwonych dla jonów sodu (Davson 1943) i glicerolu (Jacobs i Corson 1934). Według Guzmana Barrona (1951) w przepuszczalności powierzchni komórkowych mają odgrywać rolę głównie białka z czynnymi grupami SH.

Podjęte przez nas próby reaktywacji zablokowanych miedzią układów enzymatycznych za pomocą cysteiny, dwutiopropanolu (Guzman Barron, Kalnitsky 1947) oraz dwuetylodwutiokarbaminianu sodowego jako swoistego inhibitora enzymów zawierających miedź (Altschul, Abrams, Hogness 1940), potwierdziły przypuszczenia wielu autorów odnośnie znaczenia czynnych grup tiolowych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że pełną reaktywację można osiągnąć jeszcze po 6-godzinnej inkubacji w obecności toksycznych stężeń miedzi.

Według spostrzeżeń Binkleya, Warda i Hoaglanda (1944) oraz opinii Guzmana Barrona (1951) dla reaktywacji grup SH mogą być stosowane również cyjanki, które jednakowoż działają słabiej od cysteiny. Nasze doświadczenia nie potwierdziły tych spostrzeżeń. W żadnym wypadku nie nastąpił wzrost bakterii, spadek pH i znikanie glukozy z podłoża w obecności miedzi i nadmiaru cyjanków.

Podobnie próby reaktywacji blokady miedziowej przy zastosowaniu 8-oksychinoliny (w stężeniach 8×10^{-4}M, $1{,}2 \times 10^{-4}$M, i $3{,}2 \times 10^{-5}$M) jako czynnika wiążącego miedź nie dały pozytywnych wyników. Przeciwnie, w warunkach przeprowadzonych doświadczeń sama 8-oksychinolina zadziałała jako inhibitor, powodując całkowite zahamowanie wzrostu bakterii i glikolizy. Znamienną cechą zatrucia hodowli 8-oksychinoliną w stężeniu 8×10^{-4}M jest powstawanie z biegiem inkubacji bliżej nieokreślonego redukującego metabolitu. Podobny związek redukujący został wykryty w hodowlach *E. coli* zatrutych jodooctanem (Opieńska-Blauth, Madecka-Borkowska i Borkowski 1951) i seleninami (Opieńska-Blauth i Iwanowski 1952) oraz w normalnej hodowli *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra na pożywce syntetycznej DGK (Szymona i Sakławska-Szymonowa 1953).

Należy podkreślić doświadczenia z histydyną, która w przeciwieństwie do innych aminokwasów i histaminy wykazuje zdolność całkowitej reaktywacji wzrostu

i zużytkowania glukozy. Wyniki tych doświadczeń potwierdzają wcześniejsze spostrzeżenia Schadego (1949), któremu udało się reaktywować przy pomocy histydyny wzrost hodowli *Proteus vulgaris* zatrutej solami kobaltu.

Ostatnia seria naszych doświadczeń obejmowała próby stwierdzenia antagonizmu miedzi w stosunku do innych pierwiastków, a w szczególności do magnezu i molibdenu. Badania Abelsona i Aldousa (1950) dotyczące współzawodnictwa niektórych metali dwuwartościowych jak kobaltu, cynku, kadmu z jonami magnezu nie zostały potwierdzone w naszych doświadczeniach odnośnie do miedzi. Również próby Opieńskiej-Blauth i Iwanowskiego (1952), dotyczące reaktywacji wzrostu i przemiany węglowodanowej u *E. coli* w obecności seleninów, dały wyniki ujemne.

Na antagonistyczne działanie molibdenu i miedzi w tkankach zwierzęcych zwrócił uwagę Glass (1950). Zauważono mianowicie szczególnie charakterystyczne zmiany kostne i skórne u bydła żywionego karmą zawierającą nadmiar związków molibdenu przy niedostatecznym zaopatrzeniu w miedź. Powyższe objawy usuwano za pomocą siarczanu miedziowego. Należałoby przypuszczać, że związki molibdenu stabilizują miedź pod postacią nie nadającą się do wykorzystania bądź antagonizują czynność enzymów zawierających miedź. Według Glassa (1950) antagonistyczne działanie obu pierwiastków wiąże się z powstawaniem nietoksycznego molibdenianu miedziowego. Nasze doświadczenia potwierdziły częściowo obserwacje poczynione na zwierzętach.

Porównując obrazy zatruć wywołanych w hodowlach *E. coli* na podłożu Kosera przy pomocy inhibitorów grup tiolowych, jak jodooctanu, seleninów, a także 8-oksychinoliny oraz miedzi, widoczne jest, że blokada enzymów w schemacie przemiany węglowodanowej wywołana miedzią różni się od pozostałych. W obecności miedzi jako inhibitora przy różnych jej stężeniach (10^{-6} M—10^{-2} M) nie udało się otrzymać metabolitu o własnościach redukujących. Na podstawie naszych doświadczeń można przypuszczać, że działanie toksyczne jonów miedziowych na hodowlę *E. coli* dotyczy układów enzymatycznych z czynnymi grupami SH na wcześniejszym odcinku glikolizy w porównaniu z innymi inhibitorami grup tiolowych.

O. Саклавска-Шимонова

ВЛИЯНИЕ МЕДИ НА РОСТ И УГЛЕВОДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ КУЛЬТУРЫ *ESCHERICHIA COLI*

Резюме

Автором были произведены исследования, относящиеся к влиянию разных концентраций меди на рост и гликолиз кишечной палочки, выращиваемой на жидкой среде Козера. Рост определялся по нефелометрическому методу (шкала Мек Ферланда). Исчезание глюкозы обозначалось по методу нисходящей хроматографии распределения на бумаге, применяя бумагу Уотман Нр. I, смесь растворителей — бутанол, пиридин, вода (9 : 5 : 8). Для проявления хроматограмм автор пользовался модифицированным тестом с $AgNO_3$.

1. Установлено полное заторможение роста и гликолиза в присутствии 10^{-2} M—10^{-4}M меди. Концентрация меди 10^{-5}M вызывала полное заторможение гликолиза, однако лишь частичное роста и понижения величины pH. При концентрации меди 10^{-6} M констатировано замедление гликолиза наряду с нормальным ростом и нормальным понижением значения pH. Концентрация ниже 10^{-6} M меди не оказывала никакого влияния.

2. Попытки реактивации блокированных энзиматических систем при помощи соединений, образующих с медью комплексные соединения, а именно — цистеина, дитиопропанола и диэтилдитиокарбаминового натрия, дали положительные результаты. Это может свидетельствовать о роли групп SH в механизме токсического действия меди. Кроме того установлено полную реактивацию при помощи 2×10^{-3} M гистидина. Аналогичные попытки реактивации при помощи гистамина и других аминокислот дали отрицательный результат. Это потверждает наблюдения Шаде относительно реактивации при помощи гистидина в случае отравления культуры *Proteus vulgaris* солями кобальта.

3. Отрицательный результат попыток реактивации при помощи цианистого натрия не потвердил результатов, полученных Бинкли и его сотрудниками (1944).

4. Предпринятые попытки удаления меди со среды при помощи 8-оксихинолина в концентрациях 8×10^{-4} M, $1{,}2 \times 10^{-4}$ M и $3{,}2 \times 10^{-5}$ M, не дали положительных результатов. Один лишь 8-оксихинолин в указанных выше концентрациях оказался ингибитором, вызывающим полное прекращение роста и частичное гликолиза. Кроме того в среде обнаружено новый метаболит о восстанавливающих свойствах.

5. Попытки установления антагонистического действия ионов меди к ионам магния не согласуются с результатами Олдоса и Абельсона (1950). Однако удалось заметить антагонистическое действие меди и молибдена, что согласно с наблюдениями Гласса (1950).

O. Sakławska - Szymonowa

THE EFFECT OF COPPER ON THE GROWTH AND GLUCOSE METABOLISM IN THE FLUID CULTURES OF *E. COLI*

Summary

The effect of various concentrations of copper on *E.coli* in Koser's medium was studied. The growth of bacteria was evaluated approximatelv by the nephelometric method. The glucose uptake was observed by the paper chromatography. N-butanol, piridine, water (45:25:40) mixture was used as solvent system. Reducing compounds were detected by spraying with ammoniacal silver nitrate solution (modified test). Copper ions in concentrations 10^{-4} — 10^{-2}M showed complete inhibition of the growth and glucose metabolism. 10^{-5} M of copper caused total inhibition of the glucose uptake and marked inhibition of the growth as well as of the pH decrease. In the presence of 10^{-6} M Cu the glucose uptake was found to be retarded.

The toxic influence of copper could be reversed or prevented by cysteine, BAL and diethyldithiocarbamate (Table I and II, Fig. 1). These results were interpreted to suggest that the SH groups are of importance in the mechanism of the toxic action of Cu-ions.

In agreement with Shade's (1949) observations, the histidine used in concentration 2×10^{-3}M was able to reactivate the growth and glucose metabolism (Table III, Fig. 2). The histamine and certain aminoacids, however, were shown to give no reactivation.

The detoxifying effect of KCN, as observed by Binkley *et al* (1944), could not be confirmed.

Attempts to remove copper from the medium by use of 8-oxyquinoline resulted in complete inhibition of the growth and partial inhibition of the glucose uptake.

It is of interest to note, that in the culture with 8-oxyquinoline added in concentration 8×10^{-4}M an unknown reducing compound has appeared (Table III).

There was no effect of Mg-ions on the copper toxicity. A marked antagonism between Cu and Mo, shown by Glass (1950) to occur in animals, has been observed.

LITERATURA

1. Abelson P. H. and Aldous E., 1950: Ion antagonism in microorganisms. Interference of normal magnesium metabolism by Ni, Co, Cd, Zn, Mn. *J. Bact.* **60**:41.
2. Albert A., Rubbo S. D., Goldacre R. J. and Balfour B. G., 1947: The Influence of Chemical Constitution on Antibacterial Activity. III. A Study of 8-hydroxyquinoline (Oxine) and Related Compounds. *Brit. J. Exptl. Path.* **28**:69.
3. Altschul A. M., Abrams R. and Hogness T. R., 1940: Cytochrome—C Peroxydase. *J. Biol. Chem.*, **136**:777.
4. Binkley F., Ward S. M. and Hoagland Ch. L., 1944: Reversible inactivation of the adenosinotriphosphatase activity of myosin preparations with copper and cyanide, *J. Biol. Chem.*, **155**:681.
5. Calvery H. O., 1942: Trace elements in foods. *Food Research*, **7**:313.
6. Davson H., 1943: The Permeability of Natural Membranes. Cambridge and New York.
7. Elvehjem C. A. and Hart, E. B., 1931: Synthetic rations and hemoglobin building. A note on the Drabkin - Waggoner modification of the biazzo method for determining copper. *J. Biol. Chem.*, **91**:37.
8. Glass B., 1950: Copper Metabolism – A Symposium on animal, plant and soil relationships. Baltimore.
9. Guzman Barron E. S., 1951: Thiol Groups of Biological Importance. *Adv. in Enzymol.*, **11**:201.
10. Guzman Barron E. S. and Kalnitsky G., 1947: The Inhibition of Succinoxidase by Heavy Metals and its Reactivation with Dithiols. *Bioch. Journal*, **41**:346.
11. Jacobs M. H. and Corson S. A., 1934: The Influence of Minute Traces of Copper on Certain Hemolytic Process. *Biol. Bull.*, **67**:325.
12. Klug H. L., Moxon A. L. and Peterson D. E., 1950: The *in vivo* inhibition of succinic dehydrogenase by selenium and its release by arsenic. *Arch. of Bioch.*, **28**:105.
13. Lerner A. B. and Fitzpatrick T. B., 1950: Biochemistry of Melanin Formation. *Physiol. Review*, **30**:.
14. Naganna B. and Narayana Menon V. K., 1948: Erytrocyte Pyrophosphatase in health and disease. I. Properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **174**:500.
15. Opieńska-Blauth J., Kański M. i Stobińska L., 1949: Studia nad mechanizmem glikolizy w płynnych hodowlach pałeczki okrężnicy (*E. coli*). *Annales U.M.C.S. Sectio D.*, **4**:69.
16. Opieńska-Blauth J., Madecka-Borkowska I., 1950: Rozdzielenie cukrowców o zbliżonym współczynniku R_F z mieszanin metodą chromatografii bibułowej. *Acta Physiol. Polon.*, **1**:134.
17. Opieńska-Blauth J., Madecka-Borkowska I. i Borkowski T., 1951: Badania porównawcze nad metabolizmem laktozy, glukozy i galaktozy w płynnych hodowlach pałeczki okrężnicy (*E. coli*). *Acta Physiol. Polon.*, **2**:123.
18. Opieńska-Blauth J. i Iwanowski H., 1952: Wpływ selenu na wzrost i przemianę węglowodanową w płynnych hodowlach *E. coli*. *Acta Microbiol. Polon.*, **1**:273.
19. Porter J. R., 1947: Bacterial Chemistry and Physiology. New York and London.
20. Scuderling Y., 1933: On the Continuous Oligodynamic Effect of Elements on Bacteria. *Acta Soc. Med. Fenn. „Duodecim"*, **26**:1.
21. Schade A., 1949: Cobalt and Bacterial Growth with special reference to *Proteus vulgaris*. *J. Bact.*, **6**:00.
22. Slater E. C., 1949: Effect of sulphhydryl combining compounds on the activity of the succinic oxidase system. *Bioch. Journ.*, **45**:130.
23. Szymona M. i Sakławska-Szymonowa O., praca w przygotowaniu.

24. Tammann G. and Rienacker W., 1928: *Zeitschr. f. Anorg. Chemie*, **170**:288 cyt. wg Monier-Williams G. W., 1949: Trace Elements in Food. Chapmann Hall, London.

25. Thatcher R. W., 1934: A proposed classification of the chemical elements with respect to their function in plant nutrition. *Science*, **79**:463.

26. Trevelyan W. E., Proctor D. P. and Harrison J. S., 1950: Detection of sugars on paper chromatograms, *Nature*, **166**:440.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

R. Kowalik i E. Czerwińska

GRZYBOBÓJCZE DZIAŁANIE CZTEROCHLORO-P-BENZOCHINONU I 2,3-DWUCHLORO-1,4-NAFTOCHINONU

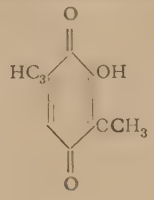
Z Zakładu Związków Toksycznych Instytutu Barwników i Półproduktów w Warszawie

WSTĘP

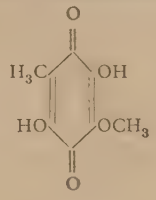
Chinony mają duży wpływ na metabolizm i wzrost różnych grup organizmów. W ciągu ostatnich 15 lat poddano badaniom szereg chinonów biologicznie czynnych w stosunku do grzybów, bakterii, drożdży i pierwotniaków.

1. Benzochinony

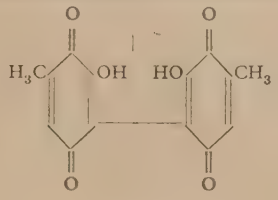
Niektóre benzochinony występujące w naturze, jak fumigatyna (Anslow i Raistrick, 1938, Baker i Raistrick, 1941), spinulozyna (Anslow i Raistrick 19388 Birkinshaw i Raistrick, 1948), fenicyna (Friedheim 1933, 1938, Poster-, nak 1938, 1939) i oosporeina (K ö g l 1944) są czynnikami hamującymi wzrost drobnoustrojów.



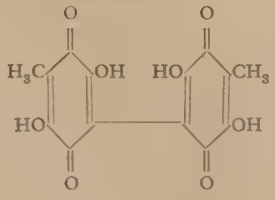
fumigatyna



spinulozyna



fenicyna



oosporeina

Erdtman i Rennerfelt (1949) wyodrębnili tymochinon, hydrotymochinon, carvacrol i tymol z drzewa *Tetraclinis articulata*, którego tkanki odznaczały się odpornością na niszczące działanie grzybów.

Na czterochloro - p - benzochinon zwrócił uwagę jako pierwszy Ter Horst w r. 1938. Produkt ten zbadali Horsfall i Sharvelle, po czym zastosowano go w rolnictwie (Cunningham i Sharvelle 1940, Leukel i Livingstone 1945, Sharvelle i Shenn 1942).

Obecnie czterochloro-p-benzochinon stosuje się już na szeroką skalę do ochrony nasion warzyw, roślin ozdobnych, zbóż (z wyjątkiem owsa i jęczmienia), lnu, do zwalczania chorób grzybowych bulw ziemniaczanych przez zanurzanie ich w roztworze przed wysadzeniem do gleby oraz do ochrony kapusty jako oprysk i w postaci pyłu (Andrade 1948, Henry 1943, Kreitlow, Garber i Robinson 1950, Mc Clellan 1950a, 1950b, Mc New 1942, Robinson 1950, Strong 1950).

Czterochloro-p-benzochinon działa hamująco w stężeniu 1 : 100000 na grzyby: *Septoria*, *Alternaria solani* i *Phytophtora infestans* (Andrade 1948). Jacks (1951) użył następujących stężeń w warunkach polowych: dla sałaty, rzepy, buraka, selera - 0,5%, dla grochu i fasoli - 0,25% oraz dla pomidora — 1%.

2. Naftochinony

Niektóre podstawione w położeniu 2, 1,4-naftochinony, występujące w roślinach, mają własności hamowania wzrostu drobnoustrojów. Do nich należy 2-hydroksy-1,4-natfochinon, wyodrębniony z liści *Lawsonia* oraz 2-metoksy-1,4-naftochinon z balsaminu ogrodowego, *Impatiens balsamina* (Little, Sproston i Fiote, 1948). Związki o bardziej złożonej budowie, jak jawanicyna i oksyjawanicyna, otrzymane z *Fusarium javanicum* (Raistrick 1950, Birkinshaw 1948), wykazują działanie antybiotyczne w stosunku do bakterii kwasoodpornych i gramdodatnich. Antybiotyczne działanie wykazuje również fuzarubina (5,8-dwuoksy 1,4-naftochinon). Podobną budowę wykazuje 2-metylo-1,4-naftochinon, czyli witamin K_3, nie występujący w naturze jako taki, lecz jedynie podstawiony w położeniu 3 łańcuchem fitylowym i farnezylowym.

Liczne prace stwierdzają działanie antybiotyczne niektórych pochodnych naftochinonów. Stwierdzono, że te same naftochinony mogą też działać pobudzająco na wzrost. Np. ftiokol (2-metylo-3-oksy-1,4-naftochinon) jest niezbędnym czynnikiem wzrostu dla *Myc. tuberculosis*.

W naszych badaniach (Kowalik, 1951) nad 2-pochodnymi 1,4-naftochinonów wykazano, że najsilniej działającą 2-pochodną 1,4-naftochinonu (z czterech badanych) był 2-metylo-1,4-naftochinon; nieco słabsze działanie wykazał 2-metoksy-1,4-naftochinon, znacznie słabsze połączenie z grupą etoksylową i najsłabsze - z grupą hydroksylową. Badania przeprowadzono na: *Fusarium orthoceras*, *Alternaria solani*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum* i *Stachybotrys atra*. Te dane o czterech 2-pochodnych 1,4-naftochinonu wskazują zatem na ważność grup CH_3 i OCH_3 przy działaniu antybiotycznym naftochinonów. Chinony antybiotyczne, występujące w naturze, również zawierają grupę metylową lub metoksylową, np. podstawione benzochinony: fumigatyna, spinulozyna, fenicyna, oosporeina; naftochinony, jak 2-metoksy-1,4-naftochinon, fuzarubina (5,8-dwuoksy- 1,4-naftochinon), jawanicyna, oksyjawanicyna i polihydroksyantrachinony, jak helmintosporyna i cynodontyna (Birkinshaw 1948, Raistrick 1950).

Związki naftochinononowe jako środki grzybobójcze, bakteriostatyczne i hamujące system enzymatyczny są z reguły bardziej czynne niż związki benzochinononowe.

Stwierdzono poza tym doświadczalnie, że chlorowanie zwiększa działanie grzybobójcze, obniża toksyczność względem roślin i zmniejsza rozpuszczalność. Produkt taki jest więc znacznie odpowiedniejszy dla celów rolniczych od innych znanych naftochinonów. Dlatego przemysł fitofarmaceutyczny lansuje stosowanie 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonu, który jest jednym z najbardziej czynnych organicznych środków grzybobójczych dotychczas opisanych.

Środek ten ochrania nasiona, liście i owoce. Nie jest tak wrażliwy na światło jak czterochloro-p-benzochinon, który przy wystawieniu na działanie światła słonecznego i deszczu utrzymuje się tylko około 7 dni.

Clayton, Goldsworthy, Haskell, Heuberger, Leukel, Mc Clellan i Miller (1949) zalecają użycie 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonu do zwalczania grzybów na buraku cukrowym, grochu, fasoli, warzywach i zbożach. Według Mc Clellana (1950b) związek ten jest skuteczny przy parchu jabłoniowym oraz ochrania ziarno zbóż.

W doświadczeniach przeprowadzonych na ziemniakach stwierdzono, że 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinon jest tylko niewiele słabszy pod względem siły grzybobójczej od mieszaniny Bordeaux, a jednocześnie nie uszkadza liści (Davidson i Rich, 1947). Opisywano również podniesienie o 82% wydajności ziemniaków na skutek działania na nie 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonem. Również Strong (1950) stosował ten związek przy zwalczaniu bakteriozy pomidorów.

2,3-dwuchloro- 1,4-naftochinon skutecznie działa przy chorobach grzybowych brzoskwini (Sharvelle i Burkholder, 1951), a wg Powella (1951) jest lepszym środkiem przeciw chorobom brzoskwini niż pochodna żelazowa i cynkowa kwasu dwumetylo-dwutiokarbaminowego. 2,3-dwuchloro- 1,4-naftochinon w stężeniu 1:250,000 hamował wzrost: *Septoria*, *Alternaria solani*, *Phytophtora infestans* (Andrade, 1948).

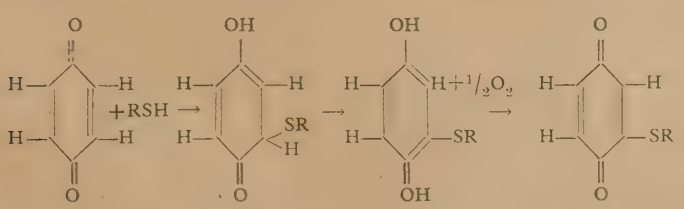
Efektywność produktu zależna jest od stanu rozproszenia. Przy większym rozdrobnieniu preparatu zwiększa się jego toksyczność i przyczepność (Hartsuijker, 1952). 2,3-dwuchloro 1,4-naftochinon może być poza rolnictwem stosowany w przemyśle włókienniczym i skórzanym (Ter Horst i Felix, 1943).

Wolf i Wolf (1950) uważają za możliwe zastosowanie czterochloro-p-benzochinonu i 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonu do konserwowania żywności z uwagi na stosunkowo małą ich toksyczność dla człowieka.

3. Mechanizm działania chinonów

Biologiczną aktywność chinonów można przypisać silnej reaktywności chemicznej. Prawie każda hipoteza ich biologicznej aktywności opiera się na wzajemnym przechodzeniu chinonu w hydrochinon. Niezależnie od tego, czy naturalne chinony są istotnymi metabolitami, czy jedynie końcowymi produktami ubocznymi, niewątpliwie wpływają one na metabolizm komórki przez silne potencjały oksydacyjne. Tworzą one łącznie ze swymi analogami system oksydo-redukcyjny, który może być ważny dla ustalania protoplazmy komórki. Dodanie syntetycznego chinonu o silnej zdolności utleniania może zmienić bilans oksydo-redukcyjny tak dalece, że zakłóci on normalne funkcje komórki.

Druga hipoteza opiera się na blokowaniu pewnych układów enzymatycznych wskutek połączenia chinonów z grupą -SH. Enzymy zatem zawierające grupę sulfhydrylową mogą tworzyć produkty addycji wg następującej reakcji:



Podobnie działają inne antybiotyki naturalne (heksenolakton, klawacyna, gliotoksyna, klawiformina, pyocjanina i penicylina), zdolne do tworzenia połączeń według podanego schematu Fiesera. Proste reakcje addycji nie wyjaśniają jednak wszystkich faktów. Chinony połączone z chlorem są bardziej czynne w stosunku do mikroorganizmów i łatwiej reagują z enzymami aniżeli niepodstawione. Hipotezę tę należałoby zatem rozszerzyć, aby objęła reakcje podstawienia (Mc New i Burchfield, 1950).

W dużej sprzeczności z powyższą hipotezą jest to, że pewne enzymy zawierające grupę sulfhydrylową nie są inaktywowane przez chinony. Jak podaje Hoffman-Ostenhof, może to wynikać z silnej reakcji utleniania grup sulfhydrylowych aż do wytworzenia wiązania dwusiarczku (wg Mc New i Burchfield, 1950).

Hochstein i Cox (1952) opisali wpływ czterochloro-p-benzochinonu na pewne fazy metabolizmu komórek *Fusarium solani* i *Saccharomyces cerevisiae*. Stwierdzili oni, że związek ten całkowicie hamował dekarboksylację kwasu pyrogronowego oraz utlenienie alkoholu do aldehydu octowego. Wpływ hamujący oba systemy enzymatyczne malał w obecności związków zawierających grupę — SH (cysteina i glutation). Ponieważ zarówno karboksylaza, jak i dehydrogenaza alkoholowa zawierają grupy — SH, prawdopodobne jest, że czterochloro-p-benzochinon redukując się utlenia równocześnie tę grupę. Według tych autorów inne enzymy zawierające grupę — SH mogą reagować podobnie.

Przypuszczalnie istnieje więcej niż jeden mechanizm działania chinonów (Mc New i Burchfield, 1950), a mianowicie:

a. Łączenie się enzymów z jądrem chinonu przez podstawienie lub addycję przy podwójnym wiązaniu.

b. Wpływ utleniający na enzymy zawierające grupy sulfhydrylowe.

c. Zmiana potencjału oksydo-redukcyjnego pewnych organizmów, jak np. bakterii gramdodatnich.

PRACE WŁASNE

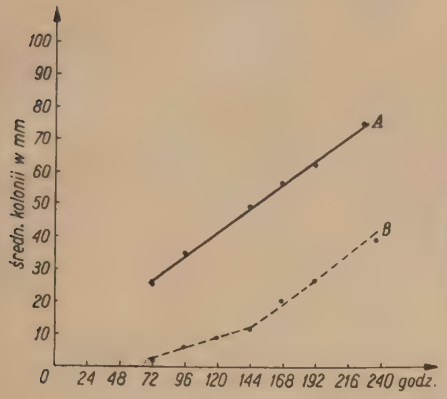
Celem pracy było oznaczenie własności grzybobójczych czterochloro-p-benzochinonu i 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonu oraz porównanie wartości tych związków przy zwalczaniu chorób grzybowych roślin. Zbadano działanie tych związków na następujące grzyby: *Alternaria solani*, *Fusarium sp.* (wyodrębnione z grochu), *Colletotrichum lindemuthianum*, *Rhizoctonia solani*, *Cladosporium herbarum* (Moroczkowski 1948, Raillo 1950, Viennot-Bourgin 1949).

Badane związki przygotowywał zespół inż. K. Galusa (benzochinon) i mgra J. Wanickiego (2,3-dwuchloro-1,4-naftochinon).

Metody badania obu związków były identyczne. Stosowano pożywkę ziemniaczaną z agarem o pH 5,5. Badanie własności grzybobójczych przeprowadzono metodą Vincent (wg Kowalika 1951) na płytkach Petriego o średnicy 100 mm. Środek grzybobójczy ważono w naczyńku wagowym, przenoszono go do wyjałowionej kolby Erlenmeyera i rozpuszczano w acetonie (1 ml acetonu na 100 ml pożywki). Następnie dodawano upłynniony agar i uzyskiwano początkowe pożądane rozcieńczenia, potrząsając kolbką dla otrzymania jednolitego roztworu. Rozcieńczenie dalsze przeprowadzano przez dodawanie płynnego agaru. Wszystkie te czynności przeprowadzano w temp. 60°. Do płytek Petriego wlewano po 20 ml pożywki zawierającej środek grzybobójczy. Po zestaleniu płytki dosuszano ją w temp. 30°. Równocześnie przygotowano płytki kontrolne z samym agarem oraz z agarem z acetonem. Płytki szczepiono zarodnikami a niektóre grzybnią. Kropla posiewu na powierzchni agaru miała średnicę 4 mm. Grzyby hodowano w temp. 22°. Co 24 godziny mierzono średnicę kolonii, robiąc pomiar od dna płytki i porównywano ją ze średnicą kolonii grzybów na płytkach kontrolnych.

Sporządzano krzywe rozmiarów kolonii w mm (rzędna) względem jednostki czasu (odcięta). Hodowle sprawdzano w ciągu 10 dni. Zahamowanie oznaczano

jako różnicę między średnicą kolonii na płytkach kontrolnych a średnicą kolonii na płytkach ze środkiem grzybobójczym o różnych stężeniach. W tabeli I uwidoczniono stężenia całkowicie hamujące wzrost użytych do badań grzybów. Wpływ badanych środków na wzrost grzybów ilustrują przedstawione krzywe wzrostu (wykresy 1—8) i fotografie 1—4. (patrz tablica I).

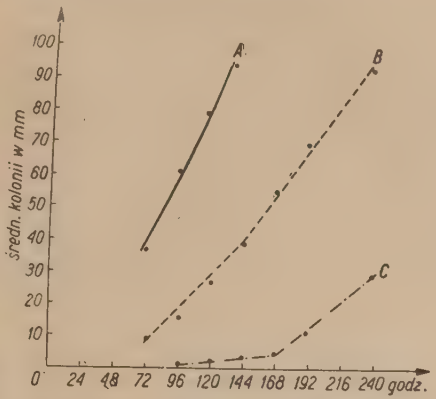


Rys. 1. Wpływ czterochloro-p-benzochinonu na *Alternaria solani*

Рис. 1. Влияние четверохлор-р-бензохинона на *Alternaria solani*

Fig. 1. Fungistatic action of tetrachlor-p-benzoquinone against *Alternaria solani*

A — kontrola
B — czterochloro-p-benzochinon, stężenie 0,06%



Rys. 2. Wpływ czterochloro-p-benzochinonu na *Fusarium sp.*

Рис. 2. Влияние четверохлор-р-бензохинона на *Fusarium sp.*

Fig. 2. Fungistatic action of tertrachlor-p-benzoquinone against *Fusarium sp.*

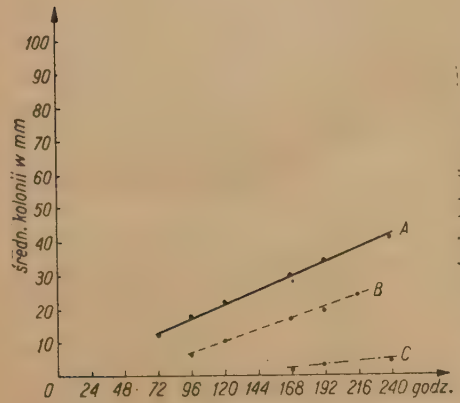
A — kontrola
B — czterochloro-p-benzochinon, stężenie 0,03%
C — czterochloro-p-benzochinon, stężenie 0,06%

Krzywe wzrostu mają przebieg prostolinijny, natomiast przy większych stężeniach wykazują pewne załamania w stadium początkowym (faza opóźniająca). Widoczne to jest zwłaszcza u *Rhizoctonia* przy stężeniu 0,002% 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonu oraz u *Fusarium* i *Alternaria* przy użyciu czterochloro-p-benzochinonu.

Z wykresów i tabeli należy wnioskować, że najbardziej odpornymi grzybami w stosunku do 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonu są: *Cladosporium herbarum* i *Rhizoctonia solani*, potem *Alternaria solani* i *Colletotrichum lindemuthianum*. Najmniej odporne spośród badanych przez nas grzybów było *Fusarium sp.*

Czterochloro-p-benzochinon działa najsilniej na *Rhizoctonia solani*, potem kolejno na: *Cladosporium*, *Fusarium*, *Alternaria*, wreszcie najsłabiej na *Colletotrichum*. Wyniki uzyskane przez nas z benzochinonem odbiegają od danych spotykanych w literaturze, ponieważ płytki ze środkiem grzybobójczym szczepiono zarówno zarodnikami, jak i grzybnią. Grzybnia wymaga, według przeprowadzonych doświadczeń, znacznie większych stężeń czterochloro-p-benzochinonu.

Przedstawione dane wskazują na znacznie silniejszą aktywność grzybobójczą 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonu niż czterochloro-p-benzochinonu.

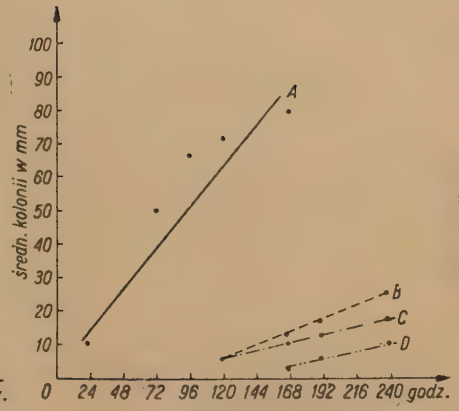


Rys. 3. Wpływ czterochloro-p-benzochinonu na *Colletotrichum lindemuthianum*

Рис. 3. Влияние четверохлор-р-бензохинона на *Colletotrichum lindemuthianum*

Fig. 3. Fungistatic action of tetrachlor-p-benzoquinone against *Colletotrichum lindemuthianum*

A kontrola
B — czterochloro-p-benzochinon, stężenie 0,0075%
C — czterochloro-p-benzochinon, stężenie 0,015%

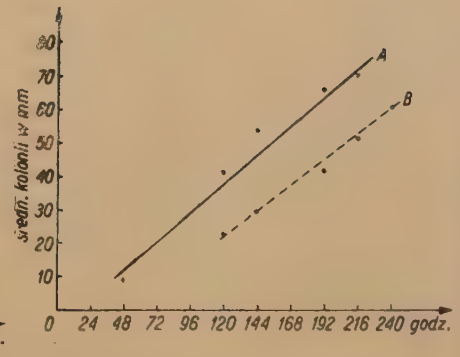


Rys. 4. Wpływ czterochloro-p-benzochinonu na *Rhizoctonia solani*

Рис. 4. Влияние четверохлор-р-бензохинона на *Rhizoctonia solani*

Fig. 4. Fungistatic action of tetrachlor-p-benzoquinone against *Rhizoctonia solani*

A — kontrola
B — czterochloro-p-benzochinon, stężenie 0,03%
C — czterochloro-p-benzochinon, stężenie 0,06%
D — czterocgloro-p-benzochinon, stężenie 0,0125%

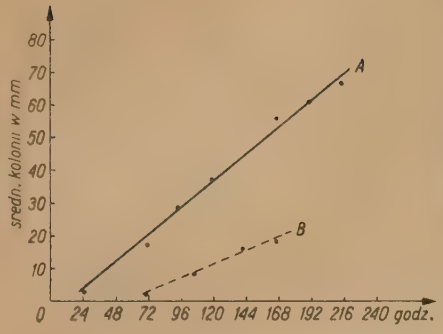


Rys. 5. Wpływ 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonu na *Alternaria solani*

Рис. 5. Влияние 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона на *Alternaria solani*

Fig. 5. Fungistatic action of 2,3-dichlor-1,4-naphtaquinone against *Alternaria solani*

A — kontrola
B — 2,3 — dwuchloro-1,4-naftochinon, stężenie 0,0005%

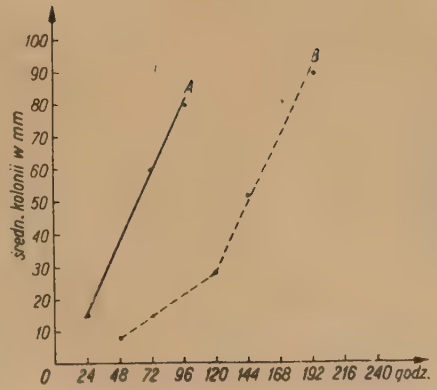


Rys. 6. Wpływ 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonu na *Fusarium sp.*

Рис. 6. Влияние 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона на *Fusarium sp.*

Fig. 6. Fungistatic action of 2,3-dichlor-1,4-naphtaquinone against *Fusarium sp.*

A — kontrola
B — 2,3 dwuchloro-1,4-naftochinon, stężenie 0,000125%

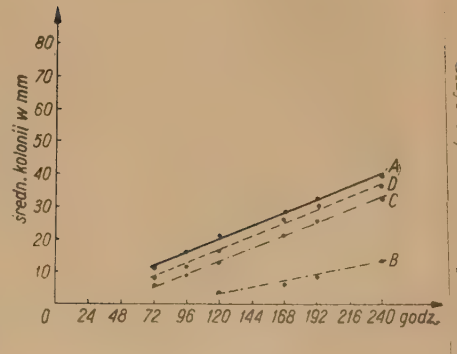


Rys. 7. Wpływ 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonu na *Rhizoctonia solani*

Рис. 7. Влияние 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона на *Rhizoctonia solani*

Fig. 7. Fungistatic action of 2,3-dichlor-1,4-naphtaquinone against *Rhizoctonia solani*

A — kontrola
B — 2,3 dwuchloro-1,4-naftochinon, stężenie 0,002%



Rys. 8. Wpływ 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonu na *Colletotrichum lindemuthianum*

Рис. 8. Влияние 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона на *Colletotrichum lindemuthianum*

Fig. 8. Fungistatic action of 2,3-dichlor-1,4-naphtaquinone against *Colletotrichum lindemuthianum*

A — kontrola
B — 2,3 dwuchloro-1,4-naftochinon, stężenie 0,0005%
C — 2,3 dwuchloro-1,4-naftochinon, stężenie 0,00025%
D — 2,3 dwuchloro-1,4-naftochinon, stężenie 0,000125%

WNIOSKI OGÓLNE

Stosowanie chinonów wydaje nam się bardzo celowe przy zwalczaniu organizmów chorobotwórczych dla roślin ze względu na bliskie pokrewieństwo tych związków z antybiotykami typu chinonowego, występującymi w naturze. 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinon i czterochloro-p-benzochinon, jako nie fitotoksyczne i posiadające dużą siłę grzybobójczą, powinny znaleźć szersze zastosowanie w rolnictwie. Czterochloro-p-benzochinon jest jednak wrażliwy na światło; należałoby go zatem stosować głównie do ochrony nasion. Obydwa związki należy szczególnie polecić do zwalczania grzybów na roślinach motylkowych, gdyż nie działają one na bakterie brodawkowe.

2,3-dwuchloro-1,4 naftochinon jest ponadto skuteczny przy niektórych bakteryjnych chorobach roślin i jest jednym z najsilniej działających, ze znanych dotychczas, organicznych środków grzybobójczych.

Tabela I

Dawki (w %) środków grzybobójczych hamujące całkowicie wzrost grzybów

Концентрации фунгицидных средств совершенно задерживающих рост грибов

Comparison of fungicidal potency of tested agents

grzyb / środek grzybobójczy	*Alternaria solani*	*Cladosporium herbarum*	*Fusarium sp.*	*Rhiz. solani*	*Collet. lindemuthianum*
2,3-dwuchloro-1,4-naftochinon	0,001	0,004	0,00025	0,004	0,001
czterochloro-p-benzochinon	0,125	0,125	0,125	0,25	0,03

Р. Ковалик и Е. Червинска

ФУНГИЦИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЧЕТВЕРОХЛОРО-Р-БЕНЗОХИНОНА И 2,3-ДВУХЛОРО-1,4-НАФТОХИНОНА

Резюме

Исследовано по методу Vincent действие четверохлоро-р-бензохинона и 2,3-двулхоро-1,4-нафтохинона на: *Alternaria solani, Fusarium sp.* (выделенный из гороха), *Colletotrichum lindemuthianum, Rhizoctonia solani и Cladosporium herbarum.*

Полученные результаты иллюстрируют рисунки 1 — 8 и фотографии 1 — 4.

Наиболее чувствительным на 2,3-двухлоро-1,4-нафтохинон является *Fusarium.* Нафтохинон оказался более сильно действующим фунгицидным средством, чем бензохинон (Табл. 1).

R. Kowalik and *E. Czerwińska*

THE FUNGICIDAL POTENCY OF TETRACHLOR-P-BENZOQUINONE AND OF 2,3-DICHLOR-1,4-NAPHTAQUINONE

Summary

The fungicidal action of tetrachlor-p-benzoquinone and 2,3-dichlor-1,4-naphtaquinone against *Alternaria solani, Fusarium sp., Colletotrichum lindemuthianum, Rhizoctonia solani* and *Cladosporium herbarum* was tested according to Vincent's method.

The results are presented in Figures 1—8.

Among the investigated fungi the most susceptible to 2,3-dichlor-1,4-naphtaquinone was a strain of *Fusarium*. The substituted naphtaquinone was more potent fungicidal agent than benzoquinone (Table I).

LITERATURA

1. Anslow W. K., Raistrick H., 1938: The biochemistry of microorganisms LVII. Fumigatin (3-hydroxy-4-methoxy-2,5-toluquinone) metabolic products respectively of *Aspergillus fumigatus* Fresenius and *Penicillium spinulosum* Thom. *Biochem. J.*, **32**:687.
2. Anslow W. K., Raistrick H., 1938: The biochemistry of microorganisms LIX Spinulosin (3,6-dihydroxy-4-methoxy-2,5-toluquinone) a metabolic product of a strain of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Biochem. J.* **32**:2288.
3. Andrade A. C., 1948: Progressos no estudo dos fungicidas organicos. *Biologico*, **14**:57.
4. Baker W., Raistrick H., 1941: Derivatives of 1,2,3,4-tetrahydrobenzene. Part VII. The synthesis of fumigatin. *J. Chem. Soc.* 670.
5. Birkinshaw J. H., Raistrick H., 1931: New methoxydihydroxytoluquinone produced from dextrose by species of *Penicillium* of the *Penicillium spinulosum* series. *Trans. Roy. Soc. B*:220, 245.
6. Birkinshaw J. H., 1948: Some aspects of fungal metabolism with particular reference to the production of antibiotics. *Brit. Mycol. Soc. Trans.* **30**:50.
7. Bettolo G. B. M., Borzini G., 1949: Contributi alla conoscenza del meccanismo dell' azione fungistatica. *Atti Ist. Bot. Univ. Lab. Crittogamico. Pavia*, **3**(**4**):261.
8. Bueding E., 1950: Carbohydrate metabolism of *Schizostoma mansoni*. *J. gen. Physiol.*, **33**:475.
9. Chester K. S., 1947: Nature and prevention of plant diseases. The Blakiston Co. Philadelphia.
10. Clayton E. E., Goldsworthy M. C., Haskell R. J., Heuberger J. W., Leukel R. W., Mc Clellan W. D., Miller P. R., 1949: Nation wide results with fungicides in 1948, 4-th annual report, *Plant Dis. Reptr. Suppl.*, **181**:87.
11. Cunningham H. S., Sharvelle E. G., 1940: Organic seed protectants for lima beans. *Phytopathology*, **30**:4.
12. Davidson R. S., Rich A. E., 1947: Performance of new fungicides for controlling late blight of potatoes. *Amer. Potato* **24**:35.
13. Erdtman H., Rennerfelt E., 1949: Fungicidal properties of some constituents of the heartwood of *Tetraclinis articulata*. *Acta Chem. Scand.* **3**:906.
14. Friedheim E. A. H., 1933: Respiratory function of the red pigment of *Penicillium phoeniceum*. *Compt. rend. Soc. biol.*, **12**:1030.
15. Friedheim E. A. H., 1938: Recherches sur la biochiemie des champignons inférieurs. I. Isolement du pigment rouge de *Penicillium phoeniceum* (Phoenicine). *Helv. Chim. Acta*, **21**:1464
16. Hartsuijker K., 1952: De rol der deeltjesgrootte bij fungiciden. *Rev. Applied Mycol.*, **31**:132.
17. Henry O., 1943: On the value of Spergon for seed treatment in small grain crops. *Phytopathology*, **33**:332.
18. Hochstein P. E., Cox C. E., 1952: Effect of tetrachloro-p-benzoquinone on certain fermentative enzyme systems in fungi. *Phytopathology*, **42**:11.
19. Horsfall J., 1945: Fungicides and their action. Chronica Botanica Co. Waltham.
20. Horsfall J., 1948: Fungicides in food production. *Ind. Eng. Chem.*, **40**:681.
21. Jacks H., 1951: The efficiency of chemical treatments of vegetable seeds against seed-borne and soil-borne organisms. *Ann. App. Biol.*, **38**:681.

22. Kögl F., Wessem, 1944: Fungus dyestuffs oösporein, the dyestuff of *Oöspora colorans*. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **63**:5.
23. Kowalik R., 1951: Antybiotyczne działanie 2 podstawionych 1,4-naftochinonów na niektóre grzyby niższe i efekty grzybobójcze niektórych pochodnych kwasu dwutiokarbaminowego. *Prace Głównego Instytutu Chemii Przemysłowej*, Zeszyt **2**:51.
24. Kreitlow K. W., Garber R. J., Robinson R., 1950: Investigations on seed treatment of Alfa-alfa, Red Clover and Sudan Grass for control of damping-off. *Phytopathology*, **40**:83.
25. Leukel R. E., Livingstone J. E., 1945: Smut control in sorghum and effect of dust fungicides and storage of emergence. *Phytopathology*, **35**:645.
26. Little R. B., Sproston, Fiote, 1948: Isolation and antifungal action of naturally occurring 2-methoxy-1,4-naphtoquinone. *J. Biol. Chem.*, **174**:335.
27. Mc Clellan W. D., 1950: Results with fruit and vegetable diseases. Results with fruit diseases. *Plant Dis. Reptr. Suppl.*, **192**:120.
28. Mc Clellan W. D., 1950: Results with seed Treatment. *Plant Dis. Reptr. Suppl.*, **192**:180.
29. Mc New G. L., Burchfield H. P., 1950: Particle size in relation to the fungitoxicity of dichlornaphtoquinone. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **16**:163.
30. Mc New G. L., Burchfield H. P., 1951: Fungitoxicity and biological activity of quinones. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **16**:357.
31. Mc New G. L., 1942: Growth stimulation of peas by tetrachloro-p-benzoquinone, a fungicidal seed protectant. *Science*, **96**:118.
32. Moroczkowskij S. F., 1948: Gribnaja flora kahatnoj gnili sacharnoj swiekły. Piszczepromizdat. Moskwa.
33. Powell Dwight, 1951: Phygon XL for the control of peach blossom blight. *Plant Dis. Reptr. Suppl.*, **35**:76.
34. Posternak T., 1939: Sur les pigments de *Penicillium rubrum* et de *Penicillium citreoroseum*. *Compt. rend. Soc. Phys. Hist. Nat. Geneve*, **55**:28.
35. Posternak T., 1938: Biochemistry of the lower fungi. II. Constitution and synthesis ofphenicine and some new derivatives of 4,4-ditoluquinone. *Helv. Chim. Acta*, **21**:1326.
36. Raillo A. I., 1950: Griby roda Fusarium. Gos. Izd. Sielskochaziaistwiennoj litieratury. Moskwa.
37. Raistrick H., 1950: A region of biosynthesis. *Proc. roy. Soc. B*: 481.
38. Rich A. E., 1952: Fungicidal treatment of seed potatoes after cutting. *Phytopathology*, **42**:26.
39. Sharvelle E. G., Young H. C., Shenn B. F., 1942: The value of Spergon as a seed protectant for canning peas. *Phytopathology*, **32**:944.
40. Sharvelle E. G., Burkholder C. L., 1951: Evaluation of fungicides for the prevention of Peach-brown-rot. *Bull. Ind. Exp. Sta.*, **19**:564.
41. Schoene D. L., Tate H. D., Brasfield T. W., 1949: Use of quinones as fungicides. *Agric. Chem.*, **4**:24.
42. Spruit C. J. P., Schnilling A. L., 1945: Influence of naphtaquinones on the respiration and light emission of *Photobacterium phosphoreum*. *Rec. Trav. Chim.*, **64**:219.
43. Strong M. C., 1950: Comparison of fungicidal sprays for the control of the tomato blights. *Mich. Agr. Expt. Sta. Quart. Bull.*, **32**:338.
44. Ter Horst W P., Felix E. L., 1943: 2,3-dichloro-1,4-naphtaquinone, a potent organic fungicide. *Ind. Eng. Chem.*, **35**:1255.
45. Viennot-Bourgin C., 1949: Les champignons parasites des plantes cultivèes. Masson et Cie, Paris.
46. Wolf F. T., Wolf. F. A., 1950: Chemical agents for the control of molds on meats. *Mycologia*, **42**:3.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

J. Horoszewicz

Z BADAŃ NAD POSTACIAMI *L* DROBNOUSTROJÓW*

Z Zakładu Bakteriologii A. M. w Łodzi

Celem pracy było zbadanie wpływu chloromycetyny na zmienność drobnoustrojów.

Posługiwano się kilkoma szczepami jelitowymi, normalnymi *Escherichia coli*. Drobnoustroje hodowano na pożywce bulionowej z dodatkiem chloromycetyny w ilości 2—64 γ w 1 ml. Hodowle te wysiewano co dzień na 3% agar już bez dodatku antybiotyku.

Krótkotrwałe działanie chloromycetyny wyraża się pojawieniem niewielkich zmian w długości poszczególnych komórek. Zmiany te nie są trwałe i cofają się po 1—2 dalszych pasażach. Metoda Robinowa (hydroliza 1 N HCl i barwienie barwikiem Giemzy) uwidacznia zagęszczenie substancji chromatynowej i obecność szerszego niż normalnie pasa różowo wybarwionej plazmy.

Dłuższe hodowanie *E. coli* w obecności chloromycetyny powoduje pojawienie się w przesiewach obok kolonii gładkich (*S*) także i kolonii mających cechy fazy *R*. Mikroskopowo przeważają formy wydłużone i nitkowate osiągające 180 μ długości. Barwienie barwikiem Giemzy pozwala dojrzeć wewnątrz nich skupienia substancji bazofilnej. W celu zbadania jej charakteru zabarwiono te same preparaty metodą Robinowa. Identyczność obrazów przed i po zastosowaniu metody Robinowa, potwierdzona mikrofotografiami tych samych miejsc, dowodzi, że dostrzegalna struktura wewnątrzkomórkowa jest (w zależności od naszego stanowiska) chromatyną, jądrem czy też po prostu kwasem dezoksyrybonukleinowym.

Zaobserwowane fakty wskazują na przemiany w metabolizmie kwasów nukleinowych. Wydaje się, że zostaje upośledzona przede wszystkim synteza kwasów rybonukleinowych. Wiadomo bowiem, że właśnie duża ich ilość w plazmie uniemożliwia wybarwienie jądra prostymi sposobami. Trzeba było uciekać się do hydrolizy przy pomocy HCl. Tymczasem w moich obserwacjach poziom kwasów rybonukleinowych tak spada, że sam barwik Giemzy uwidacznia jądro. Następcza zaś hydroliza, która niemal nie dorzuca nic nowego do uzyskanego obrazu, potwierdza słuszność przypuszczeń.

Działanie antybiotyku uwidacznia się zatem bardziej na plazmie zawierającej kwas rybonukleinowy. Można przyjąć, że kwas dezoksyrybonukleinowy, jako leżący głębiej, ulega trudniej wpływowi czynników dysgenetycznych, gdyż rolę

* Badania przeprowadzone były w Zakładzie Bakteriologii A. M. w Łodzi pod kierunkiem Kierownika Zakładu prof. dra Z. Szymanowskiego.

ochronną spełniają rybonukleiniany bardziej plastyczne i odgrywające jakby mniejszą biologiczną rolę od chromatyny. Kiedy się jednak ilość kwasów rybonukleinowych zmniejszy, jądro zostaje niejako wystawione na bezpośrednie działanie czynników szkodliwych. Bardzo prawdopodobny wydaje się fakt, że zmienność opisana w dalszej części pracy ma tu swoje źródło i przyczynę.

Jeżeli hodować *E. coli* w bulionie z dodatkiem chloromycetyny przez czas dłuższy niż 7—8 dni, to po wysianiu na zwykłe podłoża agarowe otrzymujemy kolonie gładkie — *S*, szorstkie — *R* oraz kolonie drobne o średnicy od 0,02 do 0,5 mm, wypukłe, lśniące, bezbarwne, o brzegu równym, przy rozcieraniu dające wrażenie pęczniejącej substancji śluzowatej.

Opisane cechy kolonii oraz wygląd komórek je tworzących pozwolił zidentyfikować otrzymaną postać jako formę *L*.

Należy jednak zaznaczyć, że nie obserwowano, aby środek tych kolonii wrastał głęboko w podłoże i składał się wyłącznie z drobnych form ziarnistych. Formy te występują obficie w całej kolonii. Różnice między tymi obserwacjami a doniesieniami autorów obcych zalczą prawdopodobnie od odmiennych warunków i metod stosowanych przy otrzymywaniu opisywanych postaci.

W preparatach zwykłych, mazanych, drobnoustroje przedstawiają fantastyczną różnorodność pod względem kształtu. Uderza także ich wielkość — niektóre dochodzą do 80 μ długości i 4—6 μ szerokości, a jednocześnie dostrzega się obok nich formy bardzo drobne. Przede wszystkim jednak żaden drobnoustrój nie jest podobny do komórek wyjściowych. Oglądany obraz sprawia wrażenie, jakby się miało do czynienia w ogóle nie z bakteriami.

Celem połączenia obserwowanych obrazów w usystematyzowaną całość obserwowano rozwój poszczególnych drobnoustrojów od momentu wysiania na agar do utworzenia widocznych mikroskopowo kolonii.

Po 4—5 godzinnym okresie zahamowania spotyka się w miejscach wzrostu komórki o kształcie wydłużonym, które można by porównać do dżdżownic lub węży. Układają się one w pęczki po 3—4 sztuki.

Po pewnym czasie wewnątrz z początku jednolitej komórki zaczynają się zjawiać okrągłe twory przypominające na pierwszy rzut oka pęcherzyki lub wodniczki. Ilość i wielkość wodniczek rośnie tak, że wreszcie cały drobnoustrój wygląda jak woreczek z cienkiej tkaniny wypełniony kilkunastoma kulkami. Niekiedy w połowie długości komórki wydłużonej zjawia się pączek, który następnie oddziela się, przyjmuje kształt kulisty, rośnie, ulega wakuolizacji i wreszcie pęka. Płynna zawartość kulistej komórki wylewa się i jest niewidoczna na tle pożywki, podczas gdy to, co uważało się za wodniczki, zachowuje zupełnie wyraźnie swój kształt, a nawet się powiększa. Jest to tym bardziej dziwne, że komórka jako taka przestała właściwie istnieć. Obok form kulistych cykl przemian komórek może iść poprzez formy o innych niż opisane kształtach.

Różnice, jakie dostrzegamy między preparatami barwionymi a komórkami żywymi oraz polimorfizm tych ostatnich zależą w dużej mierze od słabego rozwoju błony komórkowej, która z jednej strony łatwo ulega uszkodzeniu, a z drugiej — niezbyt ściśle określa kształt komórki. Opisane przemiany i rozwój form *L* najłatwiej obserwować przez około 9—10 godzin po wysianiu. Po tym okresie śledzenie losów poszczególnych komórek w skupisku stanowiącym mikrokolonię jest bardzo utrudnione. Dopiero teraz jednak daje się uchwycić jeden ciekawy szczegół: wewnątrz mikrokolonii widać wieloboczne przestrzenie, które z powodu swej jednorodnej budowy sprawiają wrażenie jakby pustych miejsc w środku kolonii.

Niekiedy obserwuje się wewnątrz nich jakby zarysy elementów morfotycznych, przeważnie kształtu pałeczkowatego. W rozważaniach nad budową „przestrzeni pustych" należy wziąć pod uwagę dwie możliwości: pierwsza — to, że są one wypełnione uorganizowanymi, submikroskopowymi strukturami; druga — że jest to substancja koloidalna, mogąca pochodzić na przykład z wylania się płynnej zawartości wielkich form kulistych.

Po dalszych kilkunastu godzinach cały obraz zostaje opanowany przez energicznie mnożące się pałeczki o wyglądzie normalnym. Pałeczki normalne zjawiają się najwcześniej w okolicach wydłużonych końców wielkich komórek lub układają się w łańcuszek wzdłuż nich. Nasuwa to przypuszczenie, że powstają one we wnętrzu komórki olbrzymiej, a potem wywędrowują na zewnątrz. Prócz tego obserwowano początek wzrostu pałeczek zwykłych z pewnych miejsc we wnętrzu „przestrzeni pustych".

Temu zjawieniu się pałeczek normalnych odpowiada zmiana w makroskopowym wyglądzie kolonii, która po upływie dalszych 36 godzin jest płaska, rozlana, o brzegu nierównym, powierzchni ziarnistej, średnicy 5—6 mm, słowem zupełnie nie przypomina kolonii typu *L*, jakie widzimy po 12—16 godzinach. Jednak „normalny" wygląd pałeczek nie przesądza jeszcze całkowitego ich powrotu do normy, gdyż po wysianiu dają one znów komórki olbrzymie i kolonie *L*. Byłaby to zatem „potencjalna forma *L*".

Wbrew dotychczasowym doniesieniom o wielkiej nietrwałości postaci *L* na pożywkach prostych, udało mi się w jednym wypadku utrzymać formy zmienione w ciągu 7 miesięcy drogą przesiewu na zwykły agar. Po tym okresie z przesiewów zniknęły małe kolonie, a na ich miejsce pojawiły się kolonie szorstkie z pałeczkami, które już nie miały żadnych cech charakterystycznych prócz wzmożonej w stosunku do szczepu wyjściowego oporności na chloromycetynę. Szybki i trwały powrót do normy uzyskujemy przez hodowlę form *L* na pożywce płynnej. Postacie zmienione w stosunku do szczepu wyjściowego nie wykazują pod względem biochemicznym zmian jakościowych. Niekiedy tylko rozkład laktozy następuje z niewielkim opóźnieniem. Różnic w budowie antygenowej form normalnych i zmienionych przy pomocy odczynu aglutynacyjnego z żywymi drobnoustrojami nie stwierdziłem.

Dotychczasowe badania wskazują, że przejście w formy *L* u *E. coli* wywołują takie ilości chloromycetyny, które nie powodują jeszcze całkowitego zahamowania wzrostu. Przeciwnie, już wobec 1—2 γ w 1 ml ujawnia się wyraźna zmienność. Długotrwałe działanie antybiotyku po wytworzeniu form zmienionych nie odgrywa już innej roli poza stabilizacją w pewnym stopniu postaci *L*.

Pracę ilustrują mikrofotografie (Tablica II, fot. 1,2,3). wykonane za pomocą mikroskopu typu MeF.

Dalsze badania w toku.

Ю. Хорошевич

К ВОПРОСУ ФОРМ „L" МИКРООРГАНИЗМОВ

Резюме

Установлено, что хлормицетин в концентрации 2 — 64 γ мл вызывает нарушение в метаболизме рибонуклеиновой кислоту в *Escherichia coli*.

E. coli, выращиваемая 7 — 8 дней на жидкой среде, содержащей хлормицетин (от 1γ мл), образует после пересева на бульонный агар, наряду с колониями S и R, также и колонии формы L. Возникание больших шаровидных клеток было подвергнуто непрерывным наблюдениям (Табл. II. фот. 1, 2, 3).

Формы L удалось культивировать на бульонном агаре в течение 7 месяцев. Но обыкновенно скоро выступает реверсия к палочковидным формам.

J. Horoszewicz

L FORMS IN *ESCHERICHIA COLI*

Summary

Chloromycetin in the concentration 2—64 γ per ml of medium exercises a profound effect on metabolism of ribonucleic acid in *E. coli*.

E. coli grown on the fluid medium with chloromycetin (1 γ per 1 ml) transferred after 7—8 days on the nutrient-agar plate produced besides *S* and *R* colonies, also little colonies of *L*-form.

The formation of „large round bodies" was observed continously (Plate. II, Fig. 1, 2 and 3).

It was possible to preserve the *L*-form on the nutrient-agar for seven months.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

Z. Dymowska i A. Feltynowski

LEPTOSPIRY W MIKROSKOPIE ELEKTRONOWYM

Z Oddziału Parazytologii i Pracowni Mikroskopu Elektronowego P. Z. H. w Warszawie

Skonstruowanie mikroskopu świetlnego dało początek nowej erze w dziedzinie nauk biologicznych. Przyczyniło się do ich pełnego rozkwitu i postępu. Wraz z mikroskopem elektronowym wkraczamy w nowy, nieznany świat wewnętrznej struktury mikroorganizmów.

Pionierskie prace pierwszych konstruktorów mikroskopu elektronowego Knolla i Ruski (1931, 1932 a, b), Martona (1934) i innych pozwoliły nam rozszerzyć granice widzialności daleko poza zdolność rozdzielczą mikroskopu optycznego (Borries 1949, Wyckoff 1949, Feltynowski 1951).

Coraz liczniej pojawiające się doniesienia z dziedziny badań w mikroskopie elektronowym przynoszą niemal z każdym dniem nowe osiągnięcia.

Do 1942 r. morfologia leptospir opierała się jedynie na obserwacji tych organizmów w ciemnym polu oraz diagnozowaniu preparatów barwionych metodą Fontana lub Adamskiego. W tak przygotowanych preparatach stwierdzało się jedynie hakowate zagięcia na końcach ciała leptospir. Nie można jednak było prześledzić struktury wewnętrznej zbyt cienkich drobnoustrojów, których grubość leży poza granicą zdolności rozdzielczej mikroskopu optycznego (średnica ciała 0,1—0,15 μ).

Morton i Anderson (1934), Mudd, Polevitzky i Anderson (1943) jak również Wile i Kearney (1943) rozpoczęli badania nad morfologią *Treponema pallidum* i leptospir w mikroskopie elektronowym. W wyniku tych prac ustalono, że *Treponema pallidum* ma wici po bokach ciała, a leptospiry są ich pozbawione. Opracowana przez tych autorów technika przygotowania preparatów stała się podstawą do dalszych badań podjętych przez Babudieri (1949), Catera (1952) i innych.

METODA BADAŃ

W pracy naszej posługiwaliśmy się 5 szczepami leptospir: *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa*, *L. bataviae*, *L. mitis* i *L. canicola*.

Wszystkie szczepy hodowano na podłożu Kathego w temperaturze około 27°. Hodowle badane były w różnych okresach ich rozwoju począwszy od szóstego dnia do 7 miesięcy. W celu przygotowania preparatów leptospiry z czystej hodowli wirowaliśmy 30 minut przy 3 000 obrotów, osad zawieszaliśmy w jałowej wodzie destylowanej. Czynność tę powtarzaliśmy 2 lub 3

razy w celu całkowitego oddzielenia substancji podłoża. Metoda ta jednak, jako mało ekonomiczna, została zarzucona w dalszym toku naszej pracy.

Kroplę zupełnie przezroczystej hodowli leptospir zawieszaliśmy w 10 — 20 kroplach jałowej wody destylowanej. Przygotowaną zawiesinę umieszczaliśmy na odpowiednio cienkiej, 10 — 20 mμ błonce kolodionowej lub formwarowej, rozpiętej na siateczce miedzianej, przyspawanej do podstawki preparatowej. W większości wypadków tak przygotowany i odpowiednio wysuszony preparat cieniowaliśmy chromem lub palladem pod kątem 15 — 20^0 metodą Williamsa i Wyckoffa (1945). Uzyskiwaliśmy w ten sposób zwiększenie kontrastu obrazu elektronowego i efektowną jego plastyczność, spowodowaną pokryciem ciała leptospiry cienką warstewką metalu z jednej tylko strony. Zdjęcia preparatów nie cieniowanych dają nam lepszy wgląd w strukturę wewnętrzną, jakkolwiek zdjęcia preparatów cieniowanych są bardziej plastyczne. Preparat cieniowany wykazuje większą odporność na działanie intensywnego strumienia elektronów, dlatego w tym przypadku mogliśmy stosować jako błonkę nośną błonkę kolodionową, mniej odporną od formwarowej. Zdjęcia wykonywaliśmy przy pomocy mikroskopu elektronowego konstrukcji szwedzkiej Siegbahna-Schönandera.

Używano powiększeń w mikroskopie elektronowym w granicach 5 000 — 11 000 razy. Następnie zdjęcia te były powiększane drogą optyczną około 3 razy. W pracy naszej pominęliśmy zalecaną przez Babudieri (1949) metodę utrwalania leptospir w kwasie osmowym, jako naszym zdaniem niekonieczną.

WYNIKI

Założeniem naszej pracy było stwierdzenie: 1) występowania włókna osiowego, 2) występowania błony komórkowej, 3) struktury plazmy, 4) ewentualnych zmian zachodzących w strukturze plazmy zależnie od wieku hodowli.

W wyniku pracy stwierdziliśmy, że składową częścią komórki leptospir jest tzw. włókno osiowe, owinięte spiralnie wokół protoplazmy. Widoczne jest ono tak w młodych(fot.1)*, jak i w starych hodowlach (fot. 2), w preparatach cieniowanych (fot. 3,4), jak i nie cieniowanych (fot. 5). Włókno to ma jednorodną strukturę i przebiega na całej długości ciała leptospiry, a nie tak, jak sądził Uhlenhuth i Fromme (1930), jedynie w części środkowej komórki. Na całej swej długości jest ono jednakowo grube i wykazuje dużą odporność na działanie czynników litycznych. Widoczne to jest w starych siedmiomiesięcznych hodowlach, w których protoplazma uległa rozpadowi, mimo to włókno pozostało i przyjęło kształt bardziej prostej, względnie nieznacznie skręconej spirali (fot. 6, 7). W starych wielomiesięcznych hodowlach, zależnie od bujności wzrostu szczepu, spotykało się włókna w formie nici łączącej dwa skupienia substancji o kształcie kulistym (fot. 8). Są to prawdopodobnie tzw. „ziarnistości", obserwowane przez szereg autorów w ciemnym polu, a uważane za stadia rozwojowe przez Brumpta (1949), Hamppa (1951) lub za formy degeneracyjne przez Jacoba (1947).

Formy te występowały u nas przeważnie w starych hodowlach 7-i 9-miesięcznych, z których parokrotnie udało się nam po przesianiu na nowe podłoże otrzymać bogate szczepy.

W starych hodowlach na skutek rozpadu protoplazmy zmniejsza się grubość ciała leptospiry a grubość włókna leży już poza granicą zdolności rozdzielczej mikroskopu optycznego.

* Fotografie od 1-12 zamieszczono na tablicy III i IV.

W ciemnym polu błyszczą więc skupienia substancji nagromadzonych na końcach włókien, dając wrażenie form ziarnistych. Włókno w ciele leptospir nie stanowi włókna podporowego, jak wskazują prace Catera (1952). Jest ono raczej włóknem sprężystym, rozciągliwym, stanowiącym narząd ruchu. Za jego elastycznością przemawia fakt wyginania się ciała leptospiry w różnych kierunkach i owijania się wokół siebie (fot. 10).

Za kurczliwością włókna przemawia również zdjęcie (fot. 11), w którym widzimy włókno skręcone w formie dwóch kłębków, połączonych nicią włókna.

Protoplazma w formie spiralnie zwiniętego walca ściśle przylega do włókna, tworząc homonomicznie ułożone ogniwa łańcuszka (fot. 3, 5, 9, 10). Protoplazma wykazuje jednorodną raczej strukturę, a wyraźnych ziarnistości, o których wspomina Babudieri (1949), nie stwierdziliśmy. Ilość skrętów jest różna nawet w obrębie tego samego szczepu, niezależnie od wieku hodowli. Błony komórkowej w ciele leptospir mimo licznych preparatów nie udało się nam ustalić.

Problem podziału leptospir do chwili obecnej nie został wyjaśniony przy pomocy mikroskopu elektronowego. Możliwe, że charakterystyczny przed podziałem moment przełamywania się ciała leptospir został uchwycony na zdjęciu (fot. 12). W miejscu podziału włókno wydaje się grubsze.

Reasumując wyniki naszych obserwacji, przeprowadzonych na paru szczepach leptospir w różnych okresach ich rozwoju, możemy powiedzieć, że w ciele leptospir włókno osiowe występuje wyraźnie i ma ono charakter włókna kurczliwego. Protoplazma wykazuje strukturę jednorodną i szybciej ulega autolizie niż włókno osiowe. Błony komórkowej nie stwierdza się.

З. Дымовска и *А. Фельтыновски*

ЛЕПТОСПИРЫ В ЭЛЕКТРОННОМ МИКРОСКОПЕ

Резюме

Исследовано при помощи электронного микроскопа пять штаммов лептоспир в различные периоды их развития, начиная с 6 дня до семи месяцев. На основании полученных наблюдений установлено:

1) существование осевого волокна,
2) протоплазма быстрее подвергается автолизу, чем осевое волокно,
3) протоплазма проявляет однородную структуру,
4) клеточной оболочки не удалось обнаружить.

Z. Dymowska and *A. Feltynowski*

ELECTRON MICROSCOPE STUDIES ON *LEPTOSPIRA*

Summary

Five strains of *Leptospira* in different development stages (6 days to 7 months) have been investigated using the electron microscope.

The results of the observations demonstrate:

1. the existence of an axial fibre,
2. that autolysis of protoplasm proceeds faster than that of the axial fibre,
3. the protoplasm appears to have a homogen structure,
4. the existence of a cell membrane could not be confirmed.

LITERATURA

1. Babudieri B., 1948: Ricerche di Microscopia Elettronica (Studio del genere *Leptospira*). *Rend. Inst. Sup. Sanit.*, **11**:127.
2. Borries B., 1949: Die Übermikroskopie. Verlag Dr Werner Saenger, Berlin.
3. Brumpt E., 1949: Précies de Parasitologie. L'académie de médicine, Paryż.
4. Cater D. B., 1952: Electron microscopic evidence on the structure of spirochaetes. *Nature*, **169**:944.
5. Feltynowski A., 1951: Mikroskop elektronowy. Rozdz. 48, w F. Przesmycki: „Bakteriologia Praktyczna", P. Z. W. L., Warszawa.
6. Hampp E., 1951: Further studies on the significance of spirochetal granules, *J. Bact.*, **62**:347.
7. Jacob A., 1944: Über die Morfologie der *L. canicola*. *Mediz. Klin.*, **42**:1.
8. Knoll M. und Ruska E., 1932a: Das Elektronenmikroskop. *Zeits. Phys.* **78**:318.
9. Knoll M. und Ruska E., 1932b: Beitrag zur geometrischen Elektronenoptik, *Ann. Phys.*, **12**:607.
10. Marton L., 1934: La microscopie électronique des objets biologiques. *Bul. Acad. Roy. Belg.*, **20**:439.
11. Morton H. E. and Anderson T. F., 1943: The morphology of *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Leptospira canicola* as revealed by the electron microscope. *J. Bact.*, **45**:143.
12. Mudd S., Polevitzky K. and Anderson T., 1943: Bacterial morphology as shown by the electron microscope v. *Treponema pallidum*, *T. macrodentium* and *T. microdentium*, *J. Bact.*, **46**:15.
13. Ruska E. und Knoll M., 1931: Die magnetische Sammelspule für schnelle Elektronenstrahlen. *Zeits. techn. Phys.*, **12**:389.
14. Uhlenhuth P. und Fromme W., 1930: Weilsche Krankheit. In W. Kolle, R. Kraus, P. Uhlenhuth. Handbuch der pathogenen Microorganismen, t. 7, II, Jena.
15. Wile U. and Kearney E., 1943: The morphology of *Treponema pallidum* in the electron microscope. *J. Am. Med. Assoc.*, **122**:167.
16. Williams R. C. and Wyckoff R. W. G., 1945: Shadowed electron micrographs of bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **59**:265.
17. Wyckoff R. W. G., 1949: Electron Microscopy, Interscience Publishers, New York.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

K. Obojska

ROZKŁAD WĘGLOWODORÓW NASYCONYCH I NIENASYCONYCH PRZEZ MYKOBAKTERIE SAPROFITYCZNE

Z Zakładu Fizjologii Roślin UW w Warszawie

WSTĘP

W latach od 1903 do 1925 Söhngen, a następnie pracownicy Instytutu Higieny w Würzburgu, Buttner oraz Haag, rozpracowali zagadnienie wzrostu mykobakterii saprofitycznych na parafinie, nafcie, oleju parafinowym, kauczuku itp.

Zdolność rozkładania parafiny przez mykobakterie jest tak znaczna, że pożywka zawierająca parafinę może być uważana za pożywkę selektywną dla saprofitów z rodziny *Mycobacteriaceae*.

W niniejszej pracy użyto mykobakterii otrzymanych z Państwowego Instytutu Przeciwgruźliczego w Warszawie lub wyizolowanych w naszym zakładzie. Są to następujące szczepy: 1) *Mycobacterium lacticola* (*planum* Haag), 2) *M. lacticola* (*friburgense*), 3) *M. phlei*, 4) *M. phlei* (*Pellegrino*), 5) *M. smegmatis*, 6) *M. hyalinum*.

Celem niniejszej pracy było:

1) zbadanie, od czego zależy zdolność rozkładania parafiny przez wymienione bakterie, a szczególnie — jak twierdził Haag — czy zależy ona od charakterystycznej dla danego gatunku parafiny liczby jodowej, będącej wskaźnikiem zawartych w niej związków nienasyconych;

2) stwierdzenie wpływu zawartości procentowej olefin, czyli związków o charakterze nienasyconym, na podatność na rozkład bakteryjny poszczególnych frakcji ropy naftowej;

3) stwierdzenie rozkładu kauczuku tak naturalnego, jak i syntetycznego, który z dostępnych nam węglowodorów miał największą ilość wiązań podwójnych międzywęglowych jako polimer izoprenu;

4) stwierdzenie zdolności rozkładania naftalenu i antracenu przez badane gatunki.

Wg panujących poglądów, opartych szczególnie na podstawie danych Haaga, rozbicie wiązania podwójnego dostarcza organizmom, przyswajającym związki zawierające takie wiązania, pokaźne ilości energii. Postaramy się przebadać, czy istnieje jakakolwiek zależność między ilością wiązań podwójnych, występujących w danym węglowodorze, a jego przyswajalnością.

Szybkość rozkładu i ilość rozłożonego węglowodoru oznaczano przez sporządzenie bilansu CO_2, zakładając, że gram parafiny odpowiada 3,1 g CO_2.

Motywując wybór węglowodorów jako źródła węgla dla naszych bakterii stwierdzamy, że węglowodory takie jak: parafina, kauczuk, nafta, naftalen, antracen, wykazują największy ilościowy stosunek węgla do wodoru, bo około 6 : 1, a w wypadku kauczuku nawet nieco więcej. Drugą cechą tych substancji jest ich duża odporność na wpływy otoczenia, jak np. temperatura, światło, para przegrzana itp., co szczególnie objawia się przy sterylizacji tych substancji zwykłymi metodami laboratoryjnymi. Ta ich trwałość znajduje wyraz między innymi w tym, że nie zmieniają one przy sterylizacji pH pożywki.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Na wstępie należy zaznaczyć, że każdego węglowodoru użyto w ilości 1 g na 100 ml pożywki syntetycznej.

a) Jako pierwszego składnika węglowodorowego użyto ropy naftowej. Mieliśmy trzy rodzaje ropy naftowej: 1) Ropa naftowa poddana tylko rafinacji kwaśnej; ropa ta zawierała 0,009% popiołu; skład popiołowy zbadany spektralnie wykazał obecność kationów: żelaza, wapnia, magnezu, potasu, sodu, manganu, wanadu, niklu, litu, dwutlenku krzemu oraz pięciotlenku fosforu. Jej ciężar właściwy, sprowadzony do temp. 15°, wynosił 0,800. 2) Nafta przez nas nie oczyszczona, preparat handlowy, zawierała: 0,01% N oznaczonego metodą Kjeldahla, 0,0062% N oznaczonego metodą van Slyke'a, ciężar właściwy 0,830, liczba kwasowa 1,7. Zawartość popiołowa 0,0105% do 0,011%, spektralnie wykazano te same składniki. 3) Ropa naftowa otrzymana drogą destylacji frakcjonowanej, którą przeprowadzono po rafinacji kwaśnej. Ropa ta nie zawierała składników popiołowych, jej liczba kwasowa wynosiła 0,00. Ciężary właściwe obliczono tu dla poszczególnych frakcji.

Należy dodać, że olefiny nie występują jako stały składnik ropy naftowej, lecz powstają w niej na skutek oczyszczania przez rozpad związków nasyconych.

Nie usuwaliśmy olefin występujących w poszczególnych frakcjach ropy, ponieważ zależało nam na ich obecności w pożywce.

Oznaczone punkty anilinowe dla danych frakcji mówią o przewadze w naszej nafcie węglowodorów parafinowych.

Dla każdego z węglowodorów przygotowano pożywkę syntetyczną wg Söhngena, dodając na litr pożywki syntetycznej po 1 ml płynu Hoaglanda w modyfikacji Bassalika.

Nad pożywką syntetyczną umieszczono grzybek szklany, przy pomocy którego nasycano wnętrze parami nafty, a dla uniezależnienia pożywki od prężności pary danej frakcji ropy naftowej dano bezpośrednio na powierzchnię pożywki po jednej kropli ropy naftowej.

W wyniku doświadczeń okazało się, że spośród badanych gatunków tylko *Mycobacterium lacticola* (*planum* Haag) może korzystać z nafty jako źródła węglowodorów. Stosowana syntetyczna pożywka z podłożem agarowym (oprócz kontrolnej syntetycznej płynnej z gliceryną), jakkolwiek dała identyczne wyniki, nie może w tym wypadku być brana pod uwagę, gdyż agar użyty zawierał od 0,2% do 0,6% galaktozy jako produktu jego częściowej hydrolizy oraz domieszki: mannozy, arabinozy i fukozy, które prawie zawsze występują w agarze.

b) Jako drugiego składnika węglowodorów użyto parafin posiadających następujące własności:

	Temp. top.	Liczba jodowa	Zawartość cerezyny
1.	39°	4,8	20%
2.	45°	4,2	3%
3.	55°	3,9	0%

Odczyn wszystkich parafin był obojętny.

Parafina została, choć w różnym stopniu, rozłożona przez wszystkie szczepy posiadanych przez nas mykobakterii. Stopień rozkładu parafiny został wyliczony z ilości oznaczonego CO_2, jaki powstał przy jej rozkładzie, poza tym przez ustalenie ilości pozostałej parafiny.

Z wyników doświadczeń należy wnioskować że: 1) parafina rozkładana jest przez nasze bakterie w bardzo różnym stopniu, zależnie od gatunku bakterii; 2) zużycie parafiny zależne jest od wielkości powierzchni styku bakterii z parafiną; stałej powierzchni styku pożywki z parafiną nie można było osiągnąć; w naszych doświadczeniach wynosiła ona przeciętnie 12 cm^2; 3) z danych doświadczalnych co do rozkładu parafiny bynajmniej nie wynika, jakoby istniała jakakolwiek zależność stopnia rozkładu parafiny od jej liczby jodowej; 4) stwierdzono, że parafina o punkcie topnienia 39° po wstawieniu do termostatu w temp. 31—32° uległa częściowemu nadtopnieniu, przez co zwiększyła swoją powierzchnię w stosunku do pierwotnej.

c) Trzecim składnikiem węglowodorowym był nie ulegający zupełnie rozkładowi antracen.

d) Czwarty składnik, kauczuk, nie był rozkładany przez nasze gatunki mykobakterii. Używaliśmy następujących rodzajów kauczuku: kauczuk naturalny — biała krepa (pale crepe); kauczuk brunatny (smoked sheets), kauczuk syntetyczny — butadien S. K. A_{35}; butadien S. K. A_{50}.

Obydwa ostatnie są polimerami pewnych frakcji ropy naftowej. Popiół wszystkich kauczuków przebadano polarograficznie, a badania te wykazały obecność sodu. Kauczuk nie był ponadto wulkanizowany ani też nasycany przyśpieszaczami wulkanicznymi.

DYSKUSJA

Wbrew danym z literatury stwierdzono, że parafina jest rozkładana niezależnie od jej liczby jodowej. Parafina pozostała z rozkładu bakteryjnego nie wykazała zmiany liczby jodowej, co dowodziłoby braku wybiórczości w stosunku do parafinowych olefin.

Wyprowadzone przez Haaga wnioski, jakoby parafina oczyszczona kwasem siarkowym i poddana destylacji próżniowej została przez te operacje pozbawiona liczby jodowej i na skutek tego mogła być atakowana przez bakterie, z dzisiejszego punktu widzenia trzeba wytłumaczyć wadliwymi założeniami stosowanej przez niego metody. Mianowicie przy wypłukiwaniu wodą sulfonianów parafin nie pozbywamy się całości sulfonianów, gdyż sulfoniany wyższych parafin są bardzo trudno rozpuszczalne w wodzie. Poza tym część sulfonianów powstaje prawdopodobnie dopiero w czasie samej destylacji próżniowej parafiny z resztkami kwasu siarkowego.

Ich trwałość w warunkach normalnych wyjaśnia nieujawnienie się liczby jodowej przez parafinę poddaną takiemu oczyszczeniu. Ujawnienie się liczby jodowej po pewnym odstaniu parafiny w pożywce tłumaczyłoby się przez działanie hydrolityczne pary przegrzanej na sulfoniany parafin, co ma miejsce w wypadku sterylizacji pożywki.

Niezdolność przyswajania przez bakterie parafiny pozbawionej liczby jodowej możemy wytłumaczyć działaniem sulfonianów olefinowych jako środków powierzchniowo-czynnych (jak wiadomo, do niedawna dodawano u nas sulfonianów parafinowych olefin oraz sulfonianów parafin pochodzenia naftowego jako domieszki do proszków mydlanych).

Ponadto gdyby ilość wiązań podwójnych decydowała o rozkładzie węglowodorów, to najlepiej powinien być rozkładany kauczuk, który w niniejszych doświadczeniach wcale nie został rozłożony przez użyte organizmy.

К. Обойска

РАЗЛОЖЕНИЕ НАСЫЩЕННЫХ И НЕНАСЫЩЕННЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ САПРОФИТИЧЕСКИМИ МИКОБАКТЕРИЯМИ

Резюме

Подвергнуто исследованиям *Mycobacterium lacticola* (*planum* H a a g), *M. lacticola* (*friburgense*), *M. phlei*, *M. phlei* (*Pellegrino*), *M. smegmatis*, *M. hyalinum* на синтетической среде Зенгена, добавляя исследуемый углеводород.

Керосин в качестве источника угля был использован лиш *M.lacticola* (*planum* H a a g).

Парафин разлагался всеми исследуемыми штаммами, но не в одинаковой степени. Не обнаружено зависимости между степенью потребления парафинов и их иодным числом.

Каучук не был атакован ни одним из исследуемых штаммов.

K. Obojska

THE BREAKDOWN OF SATURATED AND UNSATURATED HYDROCARBONS BY SAPROPHYTIC MYCOBAKTERIA

Summary

The investigations were conducted on *Mycobacterium lacticola* (*planum* H a a g), *M. lacticola*(*friburgense*), *M. phlei*, *M. phlei* (*Pellegrino*), *M. smegmatis*, *M. hyalinum* in Söhngen's medium.

The petroleum was utilized as a sole source of carbon only by *M. lacticola* (*planum* H a a g).

The paraffins were hydrolised by all investigated strains. There was no correlation between the utilisability of a paraffin and its iodine value.

Caoutchouc was resisting to the attack of tested strain.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

T. Teisseyre

WPŁYW STERYLIZACJI NA PH PODŁOŻA W ZALEŻNOŚCI OD JEGO SKŁADU

Z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Z codziennej praktyki w pracowni pożywek wiemy, że pH podłoży bakteriologicznych, których podstawą jest wyciąg mięsny i pepton względnie hydrolizaty białkowe, po sterylizacji przeważnie się zmienia. Przy sterylizacji podłoży z glukozą spostrzega się jeszcze znaczniejsze wahania pH.

Doświadczenia niniejsze miały na celu stwierdzenie, czy uda się wykreślić pewną współzależność powtarzalną między składem podłoża a wahaniami pH.

Przystępując do prób wyjaśnienia zachowania się pH podłoży po sterylizacji, rozpoczęto od możliwie prostych doświadczeń przechodząc do warunków bardziej skomplikowanych.

Sterylizacje wszystkich roztworów odbywały się przy 1 atmosferze nadciśnienia, tj. przy 121° przez 20 minut, roztworów zaś zawierających cukier w 3/4 atmosfery, tj. przy 117° przez 30 minut.

Zawartość glukozy oznaczano metodą Schoorla (Struszyński, 1950). pH mierzono na pH-metrze duńskim „typ 21" elektrodą szklaną i kalomelową. Do doświadczeń używano wyłącznie szkła obojętnego. Cyfry podane w tabelach i użyte do wykreślenia krzywych na wykresach są średnimi z trzech — pięciu doświadczeń. Różnice pomiędzy poszczególnymi odczytami wynosiły od 0,5 do 0,15 pH.

Na wstępie oznaczono zmiany pH roztworu glukozy w wodzie destylowanej przed i po sterylizacji. Sporządzono 20-procentowy roztwór glukozy o pH 6,0; po sterylizacji pH wynosiło 4,4. 2-procentowy roztwór glukozy o pH 5,9 po sterylizacji miał pH 4,5. Zawartość glukozy nie zmniejszyła się, płyn nie zmienił barwy.

Ponieważ w pożywkach syntetycznych i półsyntetycznych ilość soli odpowiadać powinna stężeniu około 1/15 M, dlatego w następnym doświadczeniu kontrolnym badano 1/15 M bufory fosforanowe o zawartości 0,2, 0,5, 1 i 2% glukozy.

Doświadczenie I: oznaczenie ilości glukozy w buforach przed i po sterylizacji.

Jak widać z tabeli I przy pH 6,0 ubytek glukozy jest mały i waha się w granicach błędu metody. Przy pH 7,0 ubytek glukozy jest większy. Największy procent ubytku glukozy jest przy pH 8,0 dla wszystkich stężeń glukozy. Procent ubytku glukozy jest większy przy jej mniejszych stężeniach niż przy większych.

Równolegle oznaczono pH buforów fosforanowych po sterylizacji. 1/15 M bufory fosforanowe o pH wyjściowym 6,0 do 8,0 nie zmieniają pH po sterylizacji. Dodatek glukozy od 0,2 do 2% powoduje spadek pH.

Tabela I

Wpływ sterylizacji na zawartość glukozy w roztworach buforowych w zależności od pierwotnego pH i stężenia cukru

Влияние стерилизации на содержание глюкозы в буферных смесях в зависимости от начального pH и от концентрации сахара

The concentration of glucose in autoclaved phosphate buffer solutions as a function of initial concentration of the sugar

pH przed sterylizacją	Początkowa ilość glukozy							
	0,2%		0,5%		1%		2%	
	ilość glukozy	% ubytku	ilość glukozy	% ubytku	ilość glukozy	% ubytku	ilość glukozy	% ubytku
6,0	0,201	0	0,505	2	1,024	1,2	1,987	0
	0,201		0,493		1,011		2,048	
7,0	0,243	13,5	0,480	9,2	0,922	6,9	1,854	7,1
	0,210		0,435		0,857		1,722	
8,0	0,163	25,1	0,448	28,9	0,922	17,1	1,887	19,2
	0,121		0,318		0,752		1,524	

Tabela II

Wpływ sterylizacji na pH buforowych roztworów glukozy w zależności od początkowego pH i stężeń glukozy

Влияние стерилизации на pH буферных растворов глюкозы в зависимости от начального pH и концентрации глюкозы

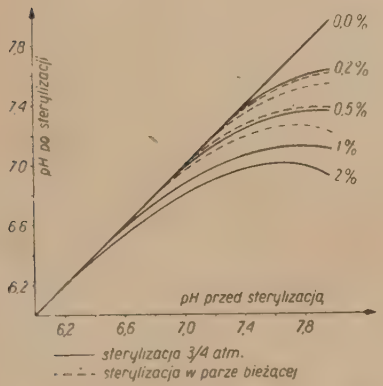
pH of autoclaved phosphate buffer solutions as a function of initial pH and initial concentration of glucose

pH przed sterylizacją	Zawartość glukozy							
	0,2%		0,5%		1%		2%	
	pH po sterylizacji 3/4 atm. 30'							
6,35	6,35		6,35		6,35		6,35	0,02
6,8	6,8		6,8		6,72	0,08	6,69	0,11
7,0	7,0		6,98	0,02	6,86	0,14	6,82	0,18
7,1	7,1		7,06	0,04	6,92	0,18	6,88	0,22
7,35	7,3	0,05	7,21	0,14	7,05	0,3	7,01	0,34
7,6	7,5	0,1	7,33	0,27	7,12	0,48	7,05	0,55
7,7	7,55	0,15	7,35	0,35	7,13	0,57	7,04	0,66
8,0	7,63	0,37	7,38	0,62	7,13	0,87	6,96	1,04

Jak widać z tabeli II, po sterylizacji buforu z glukozą pH obniża się w miarę wzrostu pH wyjściowego i wzrostu stężenia glukozy.

Wykres 1 przedstawia krzywe spadku pH buforu z glukozą po sterylizacji 3/4 atmosfery nadciśnienia 30 minut i trzykrotnie w parze bieżącej 30 minut w 24-godzinnych odstępach.

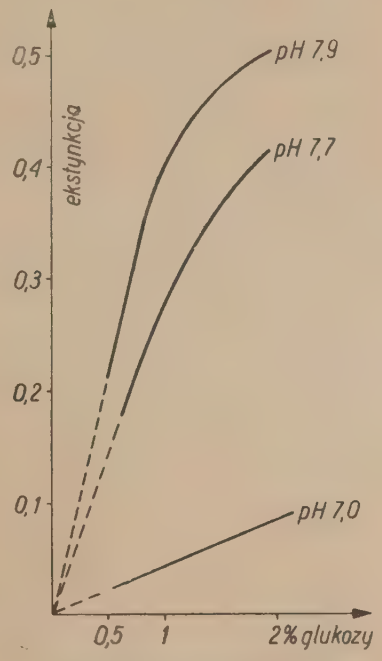
Spadek pH buforu zawierającego 0,2% glukozy jest taki sam dla obu sterylizacji i krzywe pokrywają się dla wszystkich wartości pH wyjściowego. Przy zawartości glukozy 0,5, 1 i 2% wszystkie krzywe mają taki sam paraboliczny charakter, jednak po sterylizacji w parze bieżącej wartości pH są wyższe, to znaczy obserwujemy mniejszy spadek pH.



Rys. 1. Krzywe spadku pH buforu z glukozą w czasie sterylizacji

Рис. 1. Кривые понижения величины pH буферных растворов глюкозы во время стерилизации

Fig. 1. Changes in pH of buffer-glucose solutions during sterilization



Rys. 2. Wzrost zabarwienia buforowych roztworów glukozy po sterylizacji

Рис. 2. Возрастание интенсивности окраски буферных растворов глюкозы после стерилизации

Fig. 2. Changes in intensity of brown tint of glucose solutions after autoclaving

Roztwory buforu z glukozą są bezbarwne przed sterylizacją, po sterylizacji przyjmują odcień brązowy. Nasilenie barwy badano na fotokolorymetrze Klett-Summerson — filtr zielony. Nasilenie barwy rośnie ze wzrostem pH wyjściowego i ze wzrostem stężenia cukru (wykres 2).

Podstawowym składnikiem większości rutynowych podłóż są wyciągi z mięsa cielęcego, końskiego, serc wołowych i wątroby wołowej. Wyciągi sporządza się dodając wody wodociągowej w stosunku 2 l wody na 1 kg mięsa.

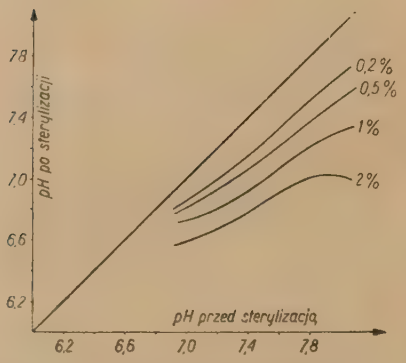
Przed przystąpieniem do doświadczeń ze sterylizacją wyciągów należało oznaczyć ilości cukru względnie substancji redukujących, zawartych w samych wy-

ciągach. Ilości cukru, oznaczone jako glukoza przeciętnie z dwu względnie trzech równolegle wykonanych oznaczeń, wynosiły: dla wyciągu cielęcego — 65 mg%; końskiego — 80 mg%; z serc wołowych — 124 mg%; z wątroby bydlęcej — 175 mg%.

Opierając się na wynikach doświadczeń buforów z glukozą i zależności spadku pH od ilości cukru należało przypuszczać, że największy spadek pH po sterylizacji będzie miał wyciąg zawierający najwięcej ciał redukujących. Doświadczenia to potwierdziły. Najmniejszy spadek pH wykazano w wyciągu cielęcym, największy — w wyciągu wątrobianym.

Przed przystąpieniem do doświadczeń z bulionami wykonano jeszcze doświadczenia z 1-procentową wodą peptonową, ponieważ 1% peptonu wchodzi w skład bulionu (pepton „Bacutil"). W 1-procentowej wodzie peptonowej o pH 7,9 pH nie ulega zmianie po sterylizacji. Po dodaniu 0,2% glukozy i wysterylizowaniu pH spada tylko o 0,05, a przy zawartości 2% glukozy — o 0,5, tj. mniej niż w roztworze buforu z glukozą o tym samym stężeniu. Roztwór peptonu działa więc silnie buforująco. W dalszym ciągu określano zmiany zachodzące w bulionach sporządzanych z różnych wyciągów (skład bulionu: wyciąg mięsny, 1% peptonu, 0,5% NaCl). pH bulionów w odmienny sposób spada po sterylizacji niż pH samych wyciągów. Różnicę tę można tłumaczyć znacznie większym zbuforowaniem bulionu dzięki obecności peptonu oraz tym, że ilość cukru w wyciągu jest mała w stosunku do ilości dodanego peptonu i nie wpływa już na spadek pH.

Z wyżej omówionych wyciągów w podłożach sporządzanych w naszej pracowni najczęściej stosowany jest bulion, którego podstawowym składnikiem jest wyciąg z serc wołowych. Dodatek glukozy waha się w granicach 0,2 do 2%.



Rys. 3. Krzywe spadku pH bulionu z glukozą
Рис. 3. Кривые понижения значения pH бульона с глюкозой
Fig. 3. Changes in pH of glucose broth during autoclaving

Z wykresu 3 widać, że spadek pH bulionu podobnie jak buforu z glukozą wzrasta ze wzrostem pH wyjściowego i ze wzrostem stężenia glukozy. Krzywe spadku pH bulionów mają charakter linijny, a nie paraboliczny jak buforów. Różnicę w charakterze krzywych możemy tłumaczyć pojemnością buforową inną dla buforu i bulionu.

Pojemność buforowa została wyrażona ilością 0,1 N NaOH zużytą na podwyższenie pH o 1,0. Pojemność buforowa bulionu jest taka sama przy pH 7,0 i 8,0 i wynosi 0,8 ml 0,1 N NaOH. Pojemność buforowa buforu fosforanowego przy pH 7,0 wynosi 2,05 ml 0,1 N NaOH, a przy pH 8,0 wynosi 1,1 ml 0,1 N NaOH, a więc w środowisku obojętnym jest 2 razy większa niż przy pH 8,0.

Coraz częściej do sporządzania pożywek zamiast wyciągu mięsnego z peptonem stosuje się hydrolizaty kazeiny. Doświadczenia robiono z kwaśnym hydrolizatem kazeiny zawierającym 0,3 g azotu w 100 ml roztworu.

Tabela III

Wpływ sterylizacji na pH hydrolizatu kazeiny w zależności od początkowego pH i stężeń glukozy

Влияние стерилизации на pH гидролизата казеина в зависимости от начального pH и концентрации глюкозы

Effect of autoclaving on pH of casein hydrolyzates as influenced by the initial pH and initial concentration of glucose

pH przed sterylizacją	Hydrolizat kazeiny bez glukozy		Początkowe stężenie glukozy							
			0,2%		0,5%		1%		2%	
6,8	6,75	0,05	6,7	0,1	6,65	0,15	6,53	0,17	6,45	0,35
7,2	7,05	0,15	7,0	0,2	6,9	0,3	6,7	0,5	6,5	0,7
7,55	7,5	0,05	7,4	0,15	7,25	0,3	7,0	0,55	6,75	0,8
7,7	7,6	0,1	7,5	0,2	7,3	0,4	7,1	0,6	6,8	0,9
8,1	8,1		8,05	0,05	7,9	0,3	7,65	0,45	7,3	0,8

Jak widać z tabeli III, spadek pH hydrolizatu o pH wyjściowym w granicach 6,8 do 7,2 następuje bez względu na zawartość glukozy. W wyższych pH spadek maleje.

Podane cyfry i wykresy są powtarzalne i możemy z nich korzystać przy sporządzaniu podłóż rutynowych bądź doświadczalnych, gdy chcemy uzyskać ściśle określone pH po sterylizacji.

T. Тейссейр

ВЛИЯНИЕ СТЕРИЛИЗАЦИИ НА pH СРЕДЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЕЕ СОСТАВА

Резюме

В водных растворах глюкозы понижение значения pH после стерилизации не зависит от концентрации сахара и равняется приблизительно 1,5.

В 1/15 М фосфорнокислых буферных смесях содержание глюкозы после стерилизации уменьшается (Табл. I). Понижение величины pH самое большое, если начальная реакция является щелочной (Табл. II, рис. 1).

Появление оттенка коричневого цвета в стерилизированном растворе становится тем отчетливее, чем выше была величина начального pH и чем больше была концентрация глюкозы (рис. 2).

Понижение значения pH в стерилизированном бульоне с добавкой глюкозы меньше чем в буферной смеси, но ход в обоих случаях аналогичен (рис. 3).

Гидролизаты казеина с глюкозой или без неё после стерилизации становятся более кислыми (Табл. III).

T. Teisseyre

THE EFFECT OF STERILISATION ON pH OF THE MEDIA

Summary

The increase in acidity of glucose solutions in water after sterilisation is independent of the concentration of sugar and amounts to 1,5 units pH.

The autoclaving of glucose solutions in 1/15 M phosphate buffer causes diminishing of concentration of sugar (Table I). The lowering of pH is more marked in alkaline solutions (Table I, Fig. 1).

Intensity of a brown tint of solutions is correlated with pH and glucose concentration of autoclaved liquids (Fig. 2).

Decline of the pH curve in autoclaved glucose-broth is less distinct than in buffer solutions (Fig. 3).

The acidity of casein-hydrolyzates (as well with glucose as without it) increases after autoclaving (Table III).

LITERATURA

1. Struszyński M., 1950: Analiza ilościowa i techniczna. 651. Centralny Urząd Szkolenia Zawodowego, Bibl. Techn. Warszawa.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

Z. Kuryło i I. Pitekówna

WPŁYW RÓŻNYCH WARUNKÓW SUSZENIA NA ŻYWOTNOŚĆ NIEKTÓRYCH SZCZEPÓW BAKTERYJNYCH

Z Państwowego Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdańsku

Z licznych metod konserwacji szczepów bakteryjnych i wirusowych oraz innych materiałów biologicznych na pierwszy plan wysuwają się metody oparte o suszenie ze stanu zamrożenia. Mimo że samo założenie metody znane jest od lat kilkudziesięciu, warunki techniczne opracowane zostały dopiero w ostatnich kilkunastu latach. Metody suszenia ze stanu zamrożenia materiałów biologicznych objęte są przeważnie patentami i dlatego mimo pozornie licznej literatury naukowej brak w piśmiennictwie szczegółowych danych. Utrudnia to znacznie rozpowszechnienie tej tak ważnej metody.

Suszenie ze stanu zamrożenia przez sublimację wody w próżni posiada szereg nazw patentowych, zależnych od metody usuwania sublimującego lodu. Założeniem tych wszystkich metod jest fakt, że materiały biologiczne, poddane działaniu bardzo niskiej temperatury, ulegają utrwaleniu, procesy biochemiczne w nich ustają, przy czym twory żywe popadają w stan zahamowania życia — anabiozy. Stany te są odwracalne z chwilą powrotu do warunków normalnych, o ile struktura substancji biologicznych nie została uszkodzona podczas procesu zamrażania. W dużej mierze odwracalność procesów zależy od temperatury zamrażania. Wielkość tworzących się kryształów lodu zmniejsza się w miarę obniżania temperatury zamrażania, a tym samym zmniejsza się możliwość mechanicznego uszkadzania struktury komórkowej danej substancji.

Materiały biologiczne mogą być przechowywane w stanie zamrożonym, co jest rzeczą kosztowną, bądź też można je suszyć w próżni z tego stanu. Wysuszony na drodze sublimacji lodu materiał może być przechowywany w próżni (w zatopionej ampułce) w temperaturze pokojowej lub w zwykłej chłodni przez szereg lat, zachowując swą żywotność i nie ulegając żadnym zmianom.

Wobec fragmentarycznych i sprzecznych nieraz danych, dotyczących optymalnych warunków suszenia ze stanu zamrożenia, celem niniejszej pracy było doświadczalne ilościowe zbadanie wpływu na przeżywalność niektórych szczepów bakteryjnych: różnych temperatur zamrażania i odmrażania, rodzaju środowiska, w którym bakterie są zawieszone, oraz różnych metod suszenia. W pracy przebadano każdy z poszczególnych czynników wchodzących w skład suszenia ze stanu zamrożenia, a następnie na tej podstawie określono optymalne warunki tego procesu.

Przebadano trzy szczepy bakteryjne: *Staphylococcus aureus* Oxford, *Escherichia coli* i *Shigella Flexneri*. W pierwszej części pracy stwierdzono stopień przeżywalności tych drobnoustrojów w procesie powolnego ich suszenia w różnych środowiskach i zawiesinach o różnych gęstościach (od 20 milionów do 4 miliardów bak-

terii w 1 ml zawiesiny) oraz w różnych warunkach zamrażania i odtajania. Zastosowano trzy temperatury zamrażania: —9°, —23° i —75° oraz dwie temperatury odmrażania: szybką 37° i powolną 4°. Suszenie jak również zamrażanie przeprowadzano w następujących środowiskach: wody destylowanej, soli fizjologicznej, inaktywowanej surowicy bydlęcej 50%, 15%-go roztworu glukozy w wodzie oraz odtłuszczonego mleka.

Stwierdzono, że suszenie drobnoustrojów powolne, a więc w temperaturze 18° przez 18 godz. nad $CaCl_2$ albo w 37° przez 18 godz. powoduje prawie całkowite ich uśmiercenie. W przypadku zamrażania zawiesin w różnych temperaturach i różnych środowiskach stwierdzono, że w miarę obniżania temperatury procent przeżycia drobnoustrojów w danym środowisku wzrasta, przy czym dla wszystkich środowisk, poza surowicą i mlekiem, stopień przeżycia zależy od gęstości zawiesiny.

Maksimum przeżycia uzyskuje się zamrażając zawiesinę bakteryjną w temperaturze —75°, w środowisku surowicy jako ośrodku dyspersyjnym, oraz odmrażając ją w 37° (85%). W przypadku suszenia w próżni drogą sublimacji lodu okazało się, że mleko jest równie dobrym środowiskiem jak surowica. Doświadczenia powyższe przeprowadzono w następujący sposób: znaną objętość zmytej jednym z omawianych środowisk 18 godzinnej hodowli agarowej przenoszono do płytek Petriego i po maksymalnym rozwinięciu powierzchni cieczy suszono ją powoli przez 18 godz. w cieplarce lub w eksykatorze nad $CaCl_2$, względnie zamrażano w odpowiedniej temperaturze, a następnie odmrażano. Ilość bakterii oznaczano przed i po doświadczeniu stosując metodę seryjnych rozcieńczeń oraz liczenie metodą Prescotta.

W drugiej części pracy stwierdzono stopień przeżywalności drobnoustrojów w procesie suszenia ich ze stanu zamrożenia. Jako optymalną temperaturę dla wstępnego zamrażania materiału przed suszeniem przyjęto —75°. Tu również zastosowano wymienione uprzednio środowiska. Znaną objętość zawiesiny wlewano do ampułek szklanych (0,2 ml). Po równomiernym rozprowadzeniu zawiesiny po ściankach ampułki i zamrożeniu w —75° poddawano ją suszeniu w wysokiej próżni (0,1 do 0,05 mm). W naszym przypadku czas suszenia wynosił około 30 min. W drugim stadium suszenia, mającym duże znaczenie dla osiągnięcia optimum przechowywalności materiału, usuwa się resztki wilgoci, utrzymując próżnię poniżej 0,05 mm słupa Hg. Całkowity czas suszenia wynosi około 3 godz. Po wysuszeniu ampułki zatapia się pod próżnią. Po sprawdzeniu stopnia próżni w ampułce przechowuje się ją w temperaturze pokojowej lub zwykłej chłodni.

W przypadku wody destylowanej i soli fizjologicznej jako ośrodków dyspersyjnych przeżywalność bakterii dla zawiesin rozcieńczonych jest prawie równa zeru. Duże procentowe przeżycie uzyskuje się dla zawiesin gęstych (20—40%). To samo dotyczy środowiska glukozy. Ciekawy jest fakt, że dla wyżej wymienionych trzech szczepów różnice w przeżywalności w tych samych środowiskach i warunkach suszenia są znikome. W przypadku surowicy i mleka przeżywalność jest tego samego rzędu zarówno dla zawiesin gęstych, jak i rozcieńczonych, przy czym w środowisku mleka przeżywa średnio 60% drobnoustrojów, a w surowicy 34%.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wyciągnięto następujące wnioski: Zawiesiny bakteryjne *S. aureus* Oxford, *Shig. Flexneri* i *Bact. coli* suszone powoli przeżywają w znikomym procencie. Zawiesiny zamrażane w —75°, dla wszystkich przebadanych środowisk i szczepów, wykazały największy procent przeżycia,

podczas gdy mrożenie w —9° i —23° uśmiercało około 80% bakterii. Przy temperaturze zamrażania —75° można utrzymać w stanie żywym większą ilość bakterii przez szybkie odtajanie zawiesiny w temperaturze 37°. W przypadkach wyższych temperatur zamrażania szybkość odmrażania nie gra roli. Maksymalny procent przeżycia (85%) drobnoustrojów podczas zamrażania uzyskuje się w —75° w środowisku surowicy.

Większą przeżywalność wykazują w środowisku wody destylowanej i soli fizjologicznej zawiesiny gęste, w surowicy zaś i mleku gęstość nie gra większej roli. Jako optymalne warunki zamrażania szczepów bakteryjnych ustalono środowisko surowicy lub mleka, zamrażane w —75°, przy czym bez względu na gęstość zawiesiny dla wszystkich trzech szczepów przeżywalność w surowicy wynosi średnio 34%, a w mleku 60%. W pozostałych zaś środowiskach stopień przeżycia zależy w dużej mierze od koncentracji zawiesiny, przy czym im gęstość zawiesiny większa, tym przeżycie większe. W miarę rozcieńczania żywotność maleje, tak że w zawiesinach o gęstości średniej 20 milionów bakterii w 1 ml przeżywa około 0,5%. Jako optymalne warunki suszenia drobnoustrojów w próżni ze stanu zamrożenia ustalono: suszenie zawiesin bakteryjnych w mleku lub surowicy, zamrażanych w —75° i suszonych w próżni (od 0,1 do 0,02 mm słupa Hg).

З. Курыло и И. Питек

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ УСЛОВИЙ ВЫСУШИВАНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕКОТОРЫХ БАКТЕРИЙНЫХ ШТАММОВ

Резюме

Исследовано жизнеспособность высушенных штаммов *Staphylococcus aureus*, *Shigella Flexneri* і *Escherichia coli* в зависимости от разных температур замораживания и отмораживания бактерийных суспензий, их густоты, среды, в которой находятся бактерии, а также в зависимости от разных методов высушивания. Установлено, что из пяти исследованных сред самые лучшие результаты получены при применении сыворотки крови или молока. Оптимальной температурой для замораживания оказалась температура —75°. Процент жизнеспособных бактерий после высушения не зависит от густоты суспензии.

Z. Kuryło and *I. Pitek*

THE EFFECT OF SOME FACTORS ON THE SURVIVAL RATE OF CERTAIN BACTERIA IN FREEZE-DRYING PROCESS

Summary

The survival rate of *Staphylococcus aureus*, *Shigella Flexneri* and *Escherichia coli* in distilled water, physiological saline, 15% solution of glucose, serum and milk after freeze-drying procedure has been examined.

The survival rate was highest in milk (60%) and in serum (34%) and was independent from the density of bacterial suspension.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

M. Horst i R. Kotelba

LABORATORYJNY SPOSÓB UTRWALANIA I PRZECHOWYWANIA SZCZEPÓW BAKTERYJNYCH

Z Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej A. M. w Poznaniu

Współczesne metody zabezpieczania szczepów bakteryjnych polegają na przechowywaniu szczepów w stanie suchym. Wysuszenia drobnoustrojów dokonuje się ze stanu zamrożenia tzw. metodą liofilizacji, tj. odwodnienia przez sublimację.

Jakkolwiek metody liofilizacji znane są z piśmiennictwa, zwłaszcza zagranicznego, i niektóre instytuty i pracownie nasze wprowadziły już tę metodę do utrwalania różnych produktów biologicznych, to jednak, wobec dużego znaczenia zagadnienia konserwacji szczepów bakteryjnych, zwłaszcza dla celów epidemiologicznych oraz produkcji surowic i szczepionek — wydało się nam celowe zajęcie się tym tematem, opracowanie metody laboratoryjnej dostępnej dla pracowni mikrobiologicznych oraz opisanie tej metody, aparatury i techniki regeneracji szczepów utrwalonych.

A p a r a t u r a. Po przeprowadzeniu licznych doświadczeń i dokonaniu uproszczeń zmontowaliśmy aparaturę składającą się z rozdzielnika do ampułek, kondensora, pompy próżniowej i kompresyjnego próżniomierza. Kondensor stanowi duża probówka szklana, zaopatrzona w trzy końcówki wylotowe, z których jedna umieszczona jest na $^1/_1$ długości od brzegu probówki a dwie — przeciwległe na $^1/_4$ długości od końca probówki. Wewnątrz tego płaszcza kondensora umocowana jest za pomocą korka gumowego druga probówka o średnicy o połowę mniejszej. Kondensor jest połączony za pomocą rurek gumowych grubościennych z rozdzielnikiem do probówek zawierających produkt suszony oraz z pompą próżniową i manometrem.

P r z y g o t o w a n i e s z c z e p ó w b a k t e r y j n y c h. Szczepy bakteryjne, przeznaczone do zakonserwowania, muzealne lub świeżo wyodrębnione (np. z pasażu na zwierzętach laboratoryjnych) hoduje się na wybiórczych podłożach stałych lub płynnych w optymalnej temperaturze w ciągu 12 — 15 godzin. Najkorzystniejszym podłożem, na którym hodowaliśmy szczepy bakteryjne do utrwalania, okazał się agar półpłynny z surowicą krwi o składzie następującym: bulion mięsny — 100 ml; agar - 0,15 g; surowica końska jałowa — 5 ml; 10% jałowy roztwór glukozy 2 ml.

S u s z e n i e s z c z e p ó w b a k t e r y j n y c h z e s t a n u z a m r o ż e n i a. Z hodowli bakteryjnych na agarze półpłynnym (12-do 15-godzinnej) pobiera się przy pomocy pipetki pasteurowskiej zawiesinę drobnoustrojów i wlewa aseptycznie po dwie krople do sześciu wyjałowionych

probówek o wymiarach 90 × 8 mm. Następnie wykonuje się przewężenie probówek, redukując ich średnicę do 2 mm za pomocą palnika gazowego, nie bliżej niż 6 cm od dna probówki. Z kolei przygotowuje się stały dwutlenek węgla i napełnia nim wewnętrzną probówkę kondensora. Przygotowane uprzednio probówki z materiałem do liofilizacji zamraża się w zestalonym CO_2 i pozostawia w chłodni w ciągu 1/2 godziny. Po upływie tego czasu podłącza się kolejno probówki do rozdzielnika w następujący sposób: z odwróconej dnem do góry probówki wyjmuje się korek z waty i w tej pozycji nakłada się rurkę gumową, za pomocą której łączy się probówkę z końcówką rozdzielnika. Po założeniu ostatniej probówki zdejmuje się natychmiast zaciskacz z rurki gumowej, łączącej rozdzielnik z kondensorem i pompą próżniową, która powinna już być w ruchu. W czasie suszenia kontroluje się często ciśnienie panujące w aparaturze, które nie powinno być wyższe niż 5×10^{-2} Torr (50 μ), i dopełnia się w miarę potrzeby probówkę kondensora stałym CO_2. Proces suszenia prowadzi się w ciągu 2 godzin.

Po ukończonym suszeniu przystępuje się do zamknięcia probówek pod próżnią w ten sposób, że kolejno stapia się i odciąga przewężenia probówek za pomocą ostrego płomienia palnika gazowego, sprawdzając każdorazowo ciśnienie w celu upewnienia się, że pozostała końcówka probówki w rozdzielniku jest szczelna i że w układzie utrzymuje się wysoka próżnia.

Ampułki z suchymi szczepami bakteryjnymi, odpowiednio ponumerowane, ułożone systematycznie w odpowiednich pudełkach, przechowuje się w szafie lub najlepiej w chłodni o temp. 4^0 do 6^0.

Szczepy utrwalone powinny być kontrolowane raz do roku na żywotność, zachowanie właściwości biochemicznych, biologicznych itp. Brak własnego doświadczenia co do maksymalnego czasokresu przechowywania — gdyż najstarszy z utrwalonych przez nas szczepów był sprawdzony po 22 miesiącach — skłania nas do przyjęcia terminu dwuletniego przechowywania szczepów bakteryjnych utrwalonych. Po tym terminie szczepy powinny być zregenerowane i z pierwszego pasażu hodowlanego ponownie utrwalone.

Regeneracja szczepów utrwalonych. Do probówki z suchym szczepem wlewa się przy pomocy pipetki pasteurowskiej około 0,2 ml jałowej wody destylowanej (lub bulionu), rozciera się dokładnie tą pipetką osad bakteryjny i pozostawia probówkę w cieplarce w ciągu 1/2 godziny. Następnie pobiera się pipetką zawiesinę bakteryjną i dodaje po kropli do odpowiednich pożywek, np. bulionu, agaru półpłynnego i agaru z krwią, rozprowadzając kroplę drucikiem po powierzchni. Posiane pożywki umieszcza się w cieplarce i po upływie 24 – 48 godzin sprawdza się mikroskopowo czystość hodowli; ewentualnie dokonuje się przesiewu na nowe podłoże celem wyodrębnienia szczepu.

W latach 1948 — 1952 utrwaliliśmy metodą suszenia ze stanu zamrożenia ponad 150 różnych szczepów bakteryjnych z pierwszego pasażu oraz ze szczepów regenerowanych. Na podstawie czteroletnich doświadczeń wyeliminowaliśmy stare metody częstego pasażowania szczepów muzealnych, opracowaliśmy aseptyczny sposób utrwalania szczepów i technikę ich regeneracji, dające gwarancję zachowania czystości wyodrębnionych szczepów. Skróciliśmy na drodze doświadczalnej czas suszenia ze stanu zamrożenia do dwóch godzin, przy czym, jak wykazały nasze badania, utrwalone szczepy zachowują żywotność, właściwości biochemiczne, biologiczne i inne cechy swoiste dla danego gatunku.

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej A. M. w Poznaniu posiada zbiór szczepów bakteryjnych, utrwalonych według opisanej metody, obejmujący około 100 różnych szczepów. Typowe szczepy drobnoustrojów chorobotwórczych stosowane są do różnego rodzaju badań naukowych, prowadzonych w zakładzie, jak również do przygotowywania ćwiczeń z mikrobiologii dla studentów medycyny, farmacji i stomatologii. Praca nad utrzymaniem zbioru szczepów bakteryjnych w Zakła-

dzie, dzięki zastosowaniu wyżej opisanej metody, została zredukowana do corocznych kontroli muzeum i utrwalania wyczerpanych szczepów.

Dążąc do znormalizowania aparatury, do utrwalania szczepów bakteryjnych metodą suszenia ze stanu zamrożenia, jak również w celu umożliwienia pracownicm liofilizowania innych produktów biologicznych, zaprojektowaliśmy model aparatu metalowego, stanowiący przenośny zespół: wymrażarki, kondensora z rozdzielnikiem, pompy próżniowej i kompresyjnego próżniomierza. Aparat był wypróbowany w Zakł. Mikrobiol. Lek. A. M. w Poznaniu i wykazał całkowitą sprawność w zastosowaniu do wyżej opisanej metody suszenia ze stanu zamrożenia. Aparat został zgłoszony jako udoskonalenie techniczne dla pracowni mikrobiologicznych.

M. Хорст и P. Котельба

ЛАБОРАТОРНЫЙ МЕТОД ФИКСИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ БАКТЕРИЙНЫХ КУЛЬТУР

Резюме

Опись упрощенного аппарата для лиофилизации бактерийных культур и пользования им.

M. Horst and *R. Kotelba*

THE METHOD OF PRESERVATION OF MICROORGANISMS IN LABORATORY

Summary

The description of a simplified apparatus for freezing-drying of bacterial cultures.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

T. Jastrzębski, J. Kochański i St. Uszyński

REGENERACJA AGARU

РЕГЕНЕРАЦИЯ АГАРА

REGENERATION OF AGAR

Z Zakładu Mikrobiologii Wydziału Wet. UW w Warszawie i z Zakładu Przemysłu Bioweterynaryjnego w Drwalewie

Sprawa regeneracji agaru ze względu na brak tego surowca i konieczność jego importu ma duże znaczenie gospodarcze.

Pracując w Zakładach Przemysłu Bioweterynaryjnego w Drwalewie próbowaliśmy początkowo zastosować metodę opartą na pracy B a e r t h l e i n a.

Jednak metoda ta, aczkolwiek zmniejszała zużycie agaru, do szerszego stosowania na skalę fabryczną nie nadawała się zarówno z tego powodu, że była kłopotliwa (usuwanie toksyn i subst. hamujących wzrost bakterii za pomocą gotowania z węglem adsorbcyjnym, klarowanie przez gotowanie z dodatkiem surowicy wołowej i filtracja na gorąco w autoklawie), jak i dlatego, że na otrzymanej przerobionej pożywce nie wszystkie bakterie mogły rosnąć.

W związku z tym została przepracowana przez nas i wypróbowana na skalę fabryczną metoda prostsza, która ostatecznie ukształtowała się i została wprowadzona do stałego użytku w formie następującego przepisu fabrycznego:

1) Obowiązkowej regeneracji podlegają wszystkie agary zwykłe, cukrowe, glicerynowe i surowicze, używane do produkcji szczepionek z bakterii nie zarodnikujących, a także agary używane do prób czystości i jałowości.

Agary z barwnikami oraz agary przerośnięte w całej swej masie różnymi bakteriami regeneracji nie podlegają.

2) Agary przeznaczone do regeneracji po dokładnym spłukaniu bakterii należy, zachowując konieczną ostrożność, przełożyć do wytarowanego emaliowanego kotła, zważyć, zadać równą ilością 1% formaliny, przykryć możliwie szczelnie pokrywą i mieszając kilka razy dziennie zostawić do odkażenia w temperaturze pokojowej na 2 — 3 dni.

Jeżeli agaru jest mało, można go zbierać przez kilka dni, uzupełniając każdorazowo formaliną.

Przy materiale wysoce zakażonym wskazane jest zważenie agaru wraz z naczyniami, zalanie go formaliną w tychże naczyniach, a po 24 - - 48 godzinach przełożenie agaru do kotła i ustalenie wagi naczyń po agarze, aby tą drogą ustalić ilość agaru wziętego do przeróbki.

3) Odkażony w ten sposób agar przepłukuje się wodą bieżącą powoli mieszając (ale specjalnie nie krusząc agaru), aby przez wzajemne tarcie poszczególnych kawałków agaru zmyć z powierzchni agaru możliwie jak najdokładniej resztki bakterii.

Następnie agar rozdrabnia się, przykrywa gazą i dziurkowaną pokrywą drewnianą, na dno naczynia doprowadza za pomocą dziurkowanej spirali z nierdzewnej rury wodę bieżącą, która przez 2 doby drogą płukania i częściowo dializy uwalnia agar od formaliny, toksyn i innych substancji hamujących wzrost bakterii. Dłuższe płukanie nie wpływa szkodliwie na przebieg regeneracji.

4) Otrzymaną i oczyszczoną w ten sposób galaretę agarową wykłada się między dwa sita wyścielone gazą lub wkłada do woreczków z gazy i umieszcza w przewiewnym i suchym miejscu na tyle czasu (zwykle 20—72 godzin), ażeby z jednego kilograma początkowej masy użytego do przeróbki agaru zostało 750 g galarety agarowej.

5) Podsuszoną galaretę agarową rozpuszcza się w aparacie Kocha i zostawia w nim na noc (pod zamkniętą pokrywą) w emaliowanym wysokim garnku, aby agar przez noc powoli sklarował się, osadził męty i zakrzepł.

6) Następnego dnia dolną część agaru (zwykle do 10%), zawierającą osad, ścina się i odrzuca, a do części klarownej dodaje się na każdy litr agaru 1/4 litra specjalnie przygotowanego tzw. poczwórnego bulionu (tj. o stężeniu ciał odżywczych i soli czterokrotnie większym niż w bulionie normalnym). Bulion ten sporządza się z wody mięsnej, przygotowanej z 2 kg mięsa na 1 litr wody, dodając do niej 4% peptonu i 2% soli kuchennej.

7) Dalsze przygotowanie agaru, nastawienie pH, filtracja i sterylizacja odbywa się podobnie jak przy agarze zwykłym.

Zalety powyższej metody są następujące: 1) Zmniejsza zużycie importowanego agaru do 1/5 — 1/10. 2) Metoda jest prosta, łatwa i tania w wykonaniu, zwłaszcza przy pracy masowej.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

S. Degen-Brandes

METODA SZYBKIEGO RÓŻNICOWANIA KOLONII „O" RODZAJU *PROTEUS I* PAŁECZEK *ENTEROBACTERIACEAE*

МЕТОДЫ СКОРОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ *PROTEUS* И ДРУГИХ ЕНДОВ *ENTEROBACTERIACEAE* В ФАЗЕ „О"

THE DIFFERENTIATION OF *PROTEUS* FORM „O" AND OTHER RODS OF THE FAMILY *ENTEROBACTERIACEAE*

Z Działu Bakteriologii i Medycyny Doświadczalnej Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

WSTĘP

Morfologiczne podobieństwo kolonii „O" odmieńca i innych pałeczek *Enterobacteriaceae* jest przyczyną częstych trudności rozpoznawczych. Badania biochemiczne są długotrwałe, a ich wynik jest stosunkowo niepewny ze względu na zmienność pałeczki odmieńca. W tych warunkach znaczenie różniczkowe posiada stwierdzenie zdolności rozkładania mocznika.

W 1941 r. Rustigan i Stuard podali skład podłoża (mocznik — 2%; wyciąg drożdżowy - 0,01%; bufor fosforanowy), które służy do wykazania działalności ureazy u pałeczki odmieńca.

Dla tego samego celu opracowali podłoże Fergusson i Hook (1943). Skład tego podłoża: mocznik 2%; bufor fosforanowy; NaCl 0,5% i alkohol etylowy 1%.

Z pracy Christensena (1946) wynika, że pałeczki odmieńca silnie rozkładają mocznik, najpóźniej w ciągu 6 godzin od chwili wysiania. Natomiast pałeczki *Paracoli*, *Aerobacter* i *Paracoli intermedium* zaczynają rozkładać mocznik dopiero po upływie 6 godzin od chwili wysiania. Pałeczki *Escherichia coli*, *Salmonella* i *Shigella* mocznika nie rozkładają.

Dla rozpoznania pałeczki odmieńca rosnącej w postaci „O":

1) Wysiewamy badany szczep na wodę peptonową i po kilku godzinach pozostawienia w temp. 37° przesiewamy na płytkę z jednoprocentowym agarem (pałeczka odmieńca rośnie na nim w postaci „H" w temp. 25°).

2) Wykonujemy badanie własności biochemicznych.

3) Przesiewamy 24-godzinną hodowlę z agaru skośnego na podłoże Christensena, które umożliwia wybiórcze działanie ureazy. Podłoże z wysianym szczepem wstawiamy do cieplarki o temp. 37°. Obserwujemy co pół godziny od chwili wysiania. Rozkład mocznika rozpoczyna się często w godzinę po wysianiu, niekiedy już po 20 minutach. Do trzech godzin otrzymujemy wybitny rozkład mocznika. Stopień rozkładu oznaczamy przez plusy. Podłoże Christensena, którego skład podamy niżej, zawiera czerwień fenolową jako wskaźnik oraz mocznik.

Używane do posiewów podłoże barwy żółtawej ma postać skoszonego słupka; pH po sterylizacji około 6,7. Z chwilą rozpoczęcia działalności ureazy następuje rozkład mocznika, a wydzielający się NH_3 powoduje podniesienie się pH do 8,6, wskutek czego podłoże przybiera czerwony kolor indykatora.

Skład podłoża wg Christensena: pepton 1,0 g; NaCl 5,0 g; KH_2PO_4 2,0 g; czerwień fenolowa 2,0 g; glukoza 1,0 g; agar 20 g; woda destylowana 1000 ml. Podłoże rozlewa się do probówek po 2,5 ml.

Wyjaławia się pod ciśnieniem 3/4 atmosfery w ciągu 20 minut. Po sterylizacji jałowo dodaje się 0,25 ml 20% roztworu mocznika w wodzie destylowanej (końcowe stężenie mocznika w podłożu wynosi 2%).

Probówki za agarem układa się na grubej pałeczce szklanej celem otrzymania częściowo skoszonego słupka.

WYNIKI

Doświadczenia porównawcze, przeprowadzone w naszej pracowni na pałeczkach gramujemnych różnych szczepów *Enterobacteriaceae*, pokrywają się całkowicie z danymi w piśmiennictwie, a mianowicie najbardziej ureo-dodatnie są pałeczki odmieńca.

Doświadczenia nasze wykazały, że wszystkie gatunki rodzaju *Proteus* rozkładają mocznik silnie (+++) w przeciągu 3 godzin.

Aerobacter rozpoczyna rozkład mocznika po 5 godzinach od chwili wysiania. *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* mocznika nie rozkładają.

Badania przeprowadzone w naszej pracowni na różnych gatunkach rodzaju *Proteus* wykazały, że rozkład mocznika przez różne gatunki nie przebiega z takim samym nasileniem w pierwszych dwu godzinach, jednak pod koniec 3 godziny stopień rozkładu u wszystkich gatunków pałeczek odmieńca wygląda jednakowo.

Naszym zdaniem 3-godzinny okres obserwacji od chwili wysiania jest dla rozpoznania wystarczający.

Przy różnicowaniu kolonii „O" pałeczek odmieńca i innych szczepów *Enterobacteriaceae* wystarcza uwzględnić ich właściwości biochemiczne i rozkład mocznika na podłożu Christensena w ciągu 3 godzin.

LITERATURA

1. Christensen W. B., 1946: Urea decomposition as means of differentiating *Proteus* and paracolon culture from each other and from *Salmonella* and *Shigella*., *J. Bact.*, **52**:461.
2. Fergusson W. W., and Hook A. E., 1943: Urease activity of *Proteus* and *Salmonella* organisms., *J. Lab. Clin. Med.*, **28**:1715.
3. Rustigian R., and Stuard C. A., 1941: Decomposition of urea by *Proteus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **47**:108.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

J. Kwapiński i H. Pietraszkiewicz

ZMIENNOŚĆ BARWIKOTWÓRCZA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* I *SERRATIA MARCESCENS* POD WPŁYWEM ALKALOIDÓW FENANTRENOWYCH

ПИГМЕНТООБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* И *SERRATIA MARCESCENS* ПОД ВЛИЯНЕЕМ ФЕНАНТРЕНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ

VARIATIONS IN PIGMENT FORMATION IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND *SERRATIA MARCESCENS* PROVOKED BY CULTIVATION IN PRESENCE OF PHENANTRENE ALKALOIDS

Zawiesiny 4 szczepów *Ps. aeruginosa* i 2 szczepów *S. marcescens* wysiewano na bulion zawierający kodeinę, dikodid lub dioninę w stężeniach: 5, 25, 100, 750 i 1000 mg %. Po inkubacji 7-dniowej przeprowadzono ekstrakcję barwików i natężenie barw w poszczególnych próbach określano w fotokolorymetrze. Stwierdzono, że w mniejszych stężeniach alkaloidy fenantrenowe działały pobudzająco na wytwarzanie barwików, w większych wstrzymująco, a wreszcie porażająco na mechanizm barwikowo-twórczy.

W wypadku szczepu *Serratia marcescens* po kilku pasażach w bulionie z kodeiną stwierdzono niezdolność wytwarzania barwika w pożywce bez alkaloidów fenantrenowych. Alkaloidy mogą być używane do innych badań nad zmiennością bakterii.

K. Matusiak

BADANIA NAD WYKORZYSTANIEM POTASU PRZEZ *ASPERGILLUS NIGER* Z TUFU FILIPOWICKIEGO

ИССЛЕДОВАНИЯ НАД ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАЛИЯ *A. NIGER* ИЗ ФИЛИПОВИЦКОГО ТУФА

UTILIZATION OF POTASSIUM FROM „FILIPOWICE" TUFF BY *ASPERGILLUS NIGER*

Z Zakładu Mikrobiologii G.I.P.R. i Spoż. w Krakowie

Tufy filipowickie stanowią obecnie bardzo cenny surowiec zawierający potas, który mógłby być wykorzystany jako nawóz potasowy. Przeróbka tufu na przyswajalny dla roślin nawóz potasowy byłaby konieczna w razie nieprzyswajalności potasu ze skały macierzystej.

Stosując metody mikrobiologicznego badania żyzności gleb przeprowadzono badania, które w rezultacie wykazały możliwość wykorzystania potasu z tufu nie przerobionego. Podczas tych badań przekonano się, że oprócz dostarczenia potasu tuf działa pobudzająco na wzrost grzybni *Aspergillus niger* w wypadku dodania go do pożywki poza wszystkimi zasadniczymi środkami pokarmowymi. Prawdopodobnie działają tutaj zawarte w tufie mikroelementy. Niezależnie od tego przeprowadzono badania nad działaniem stymulującym tufu na przebieg fermentacji alkoholowej, uzyskując jej przyspieszenie i wyższy stopień odfermentowania.

J. Opieńska-Blauth i H. Iwanowski

WPŁYW SELENU NA WZROST I PRZEMIANĘ WĘGLOWODANOWĄ W PŁYNNYCH HODOWLACH *ESCHERICHIA COLI*

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A.M. w Lublinie

Opublikowano w *Acta Microbiologica Polonica* Vol. I, nr 4, rok 1952

T. Lityński i H. Jurkowska

GLAUKONIT JAKO ŹRÓDŁO POTASU DLA KROPIDLAKA CZARNEGO (*ASPERGILLUS NIGER*)

Z Zakładu Chemii Rolnej U.J. w Krakowie

Opublikowano w *Acta Microbiologica Polonica* Vol. II, nr 1, rok 1953

H. Pikulska

PORÓWNANIE I OCENA LICZENIA BAKTERII METODĄ PŁYTKOWĄ I METODĄ KROPELKOWĄ

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej U.M.C.S. w Lublinie

Opublikowano w *Acta Microbiologica Polonica* Vol. II, nr 1, rok 1953

Z. Michna i H. Mazaraki

ANTAGONIZM BAKTERYJNY W MLEKU

(Streszczenia nie nadesłano)

J. Kowalska, M. Sabbo i Wł. Kunicki-Goldfinger

MACZUGOWCE GLEBOWE. CZ. I

Własności morfologiczne i wzrostowe

B. Tuszyńska, K. Dygdała i Wł. Kunicki-Goldfinger

MACZUGOWCE GLEBOWE. CZ. II

Własności fizjologiczne

M. Urbańska, Wł. Stachal i Wł. Kunicki-Goldfinger

MACZUGOWCE GLEBOWE. CZ. III

Cytologia

H. Doleżko, D. Miłkowska i Wł. Kunicki-Goldfinger

MACZUGOWCE GLEBOWE. CZ. IV

Rozkład węglowodorów

A. Stolarska i Wł. Kunicki-Goldfinger

MACZUGOWCE GLEBOWE. CZ. V

Występowanie w niektórych typach gleb

Wł. Kunicki-Goldfinger

MACZUGOWCE GLEBOWE. CZ. VI

Stanowisko systematyczne

Zostaną opublikowane w numerze 4, Vol. II, *Acta Microbiologica Polonica*

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

A. Luchterowa

GEOMIKROBIOLOGIA W PRZEMYŚLE NAFTOWYM

ГЕОМИКРОБИОЛОГИЯ В НЕФТЯНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

GEOMICROBIOLOGY IN THE OIL INDUSTRY

Z Zakładu Geoanalityki Instytutu Naftowego w Krakowie

W okresie ostatnich 20 lat na usługi przemysłu naftowego stanęła mikrobiologia, zwana geomikrobiologią lub mikrobiologią naftową. Nowa ta dziedzina nauki zajęła się następującymi zagadnieniami: 1. pochodzenie ropy naftowej, 2. uwalnianie ropy ze skał osadowych, 3. wykrywanie złóż ropy naftowej.

1. Egzercew stwierdził występowanie bakterii do głębokości 2000 m w rdzeniach odwiertów naftowych metodą badań bezpośrednich oraz metodą szlifów geologicznych. Na 1 g suchej masy wypada 117 mln kom. bakteryjnych.

Rittenberg przeprowadził w Basenie Kalifornijskim badania nad występowaniem bakterii redukujących siarczany w rdzeniach naftowych dna morskiego Basenu Kalifornijskiego. Należy tu podkreślić, że bakteriom redukującym siarczany przypisuje się największą rolę przy powstawaniu ropy naftowej. Okres inkubacji bakterii wynosił od 7—265 dni. Badania powyższe wykazały występowanie bakterii w obszarach roponośnych. Prowadzone są prace badawcze nad rozwiązaniem zagadnienia, czy bakterie w pewnych warunkach fizyko-chemicznych mogą wytworzyć ropę naftową. Jankowski i Zobell otrzymali w warunkach laboratoryjnych mieszaninę węglowodorów alifatycznych od C_{20}—C_{25}, jako wynik działalności bakterii redukujących siarczany.

2. Bakteriom przypisuje się ważną rolę przy uwalnianiu ropy ze skał osadowych. Zobell przeprowadził badania laboratoryjne nad oswobodzeniem ropy zaadsorbowanej w piaskowcach przy pomocy bakterii.

3. Nowy kierunek poszukiwań ropy naftowej przy zastosowaniu metody mikrobiologicznej został opracowany przez Butkiewicza, Kuzniecowa, Bokową i innych i stosowany już jest w skali doświadczalno-przemysłowej. Wybrany teren poddano analizie mikrobiologicznej, opracowując około 18 tys. próbek gleby.

Opracowanie tej metody poprzedziły liczne badania mikrobiologów (Söhngen, Wagner, Tausson), które wykazały, że istnieją mikroorganizmy szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, które rozkładają węglowodory. Stwierdzono pewną specjalizację szczepów w stosunku do węglowodorów. Węglowodory alifatyczne są na ogół łatwiej atakowane niż aromatyczne. Spośród pierwszych działaniu bakterii łatwiej ulegają te, których punkt wrzenia przekracza 150^0.

Zobell wymienia około 90 gatunków bakterii tlenowych, które mogą atakować węglowodory.

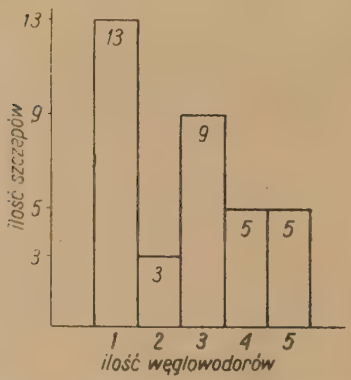
Sekcja Geobiologii I. N. zajęła się opracowaniem metody mikrobiologicznej wykrywania złóż ropy naftowej. Przede wszystkim opracowano metodykę jałowego pobierania próbek gleby. W tym celu sporządzono sondę zakończoną wyjałowioną nasadką. Przy pomocy świdra jednocalowego wiercono otwór w glebie, sondą pobierano próbki z głębokości 1,5, 2 i 3 m do jałowych probówek i przewożono do laboratorium.

Postanowiono nie wprowadzać do hodowli żadnego innego źródła węgla oprócz węglowodorów i z tego też powodu wybrano za najbardziej odpowiednie podłoże żel krzemionkowy, nasycony pożywką syntetyczną. Płytki przed zasianiem poddawane były dwukrotnej sterylizacji. Po zasianiu umieszczono je w eksykatorach z jedną z następujących mieszanin węglowodorów: oleju parafinowego, ropy naftowej, nafty, benzyny, mieszanki gazowej. Gdy dokoła cząsteczek gleby pojawi się zmętnienie spowodowane przez rozwijające się bakterie, przesiewa się je na żel i umieszcza w tych samych warunkach.

W 1 etapie pracy doprowadzano do czystych hodowli za pomocą płytek agarowych. Otrzymane czyste szczepy przeszczepiano na płynne pożywki i na żel skośny z dodatkiem węglowodorów jako źródła węgla. Przeprowadzano badania kontrolne.

Zaobserwowano charakterystyczny wzrost na żelu w obecności oleju parafinowego. Najsilniej rozwijały się bakterie w miejscu zetknięcia z olejem parafinowym. Na płynnej pożywce tworzyły kożuszek. Inaczej przedstawia się wzrost w obecności nafty. Niektóre szczepy rozwijały się dopiero w pewnej odległości od powierzchni nafty. Jeszcze wyraźniej zaznacza się ten rodzaj wzrostu w obecności benzyny.

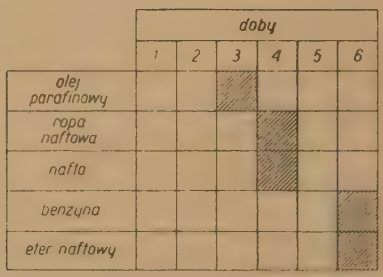
Zbadano własności biochemiczne szczepów oraz ich zdolności korzystania z innego źródła węgla, jak np. węglowodany. Po zestawieniu wyników okazało się, że największa ilość szczepów rośnie w obecności oleju parafinowego, mniejsza w obecności innych węglowodorów (wykres 1).



Rys. 1. Intensywność rozkładu węglowodorów przez bakterie.

Рис. 1. Разложение разных углеводородов бактериями.

Fig. 1. Utilization of various hydrocarbons by bacteria.



Rys. 2. Szybkość rozwoju bakterii na różnych węglowodorach.

Рис. 2. Скорость выращивания бактерий на разных углеводородах.

Fig. 2. Growth of bacteria on various hydrocarbons.

Również i okres inkubacji szczepów zależny jest od rodzaju zastosowanego do badań węglowodoru (wykres 2). Najszybciej rozwijają się one w obecności oleju parafinowego.

Celem wykazania zużycia węglowodorów przeprowadzono badania ilościowe metodą Taussona. Wyniki badań ilościowych dadzą nam obraz zużycia badanych węglowodorów przez bakterie. Söhngen bowiem podaje, że szczepy rozkładające węglowodory zużyły w tym samym czasie 15 mg nafty a tylko 8 mg parafiny. W obecnym etapie pracy nie doprowadzamy do czystych kultur i przeprowadzamy kontrolę zachowania szczepów w warunkach naturalnych. Wyhodowane szczepy z gleby terenów roponośnych umieszczamy w probówkach z żelem i pozostawiamy w odwiercie na okres jednego miesiąca. Jedynym źródłem węgla dla nich jest mieszanka gazu ziemnego z powietrzem, jaka znajduje się w odwiercie. Obecnie uzyskaliśmy wynik pozytywny tych badań. 4 szczepy wykazały silny rozwój. Są one poddawane w laboratorium analizie systematycznej i badaniom biochemicznym.

Przeprowadzamy równocześnie badania kontrolne poza laboratorium umieszczając szczepy w terenie nieroponośnym, który mamy już opracowany metodą hodowli. Jeżeli te szczepy zdadzą egzamin w czasie kontrolnych badań, to będą mogły być zastosowane jako wskaźnikowe dla obszarów roponośnych.

J. Ziemięcka

OSIĄGNIĘCIA I PLANY MIKROBIOLOGII ROLNICZEJ

Z Zakładu Mikrobiologii Rolniczej U.M.C.S. w Lublinie

Opublikowano w *Acta Microbiologica Polonica*, Vol. II, nr 1, rok 1953

W. Maliszewska

WPŁYW SZCZEPIENIA AZOTOBAKTEREM NA PLONY ROŚLIN NIEMOTYLKOWYCH

Z Oddziału Mikrobiologii Rolniczej I.U.N.G. w Puławach

Opublikowano w *Acta Microbiologica Polonica*, Vol. II, nr 1, rok 1953

K. Kuźniar

O JEDNOSTKACH PORÓWNAWCZYCH W MIKROBIOLOGII GLEBY

О СРАВНИТЕЛЬНЫХ ЕДИНИЦАХ В МИКРОБИОЛОГИИ ЦОЧВ

COMPARABLE UNITS IN THE SOIL MICROBIOLOGY

Opublikowano w *Ekologia Polska*, Vol. I, nr 1, 1953

Z Zakładu Ekologii Gleb I.H.A.R. w Puławach

Określenie ilości oraz aktywności biologicznej różnych grup drobnoustrojów w przeliczeniu na „jednostkę porównawczą" posiada w mikrobiologii gleby zasadnicze znaczenie. W literaturze są notowane trzy zasadnicze metody przeliczenia: 1) na gram suchej masy gleby, 2) na gram świeżej masy gleby oraz 3) na gram substancji organicznej gleby.

Ponieważ gleby mineralne mają duży ciężar objętościowy, zaś gleby torfowe oraz próchnicze b. mały, stąd też różni badacze porównują przejawy biologiczne zachodzące w małych objętościach gleb mineralnych z dużymi objętościami gleb torfowych. Natomiast w przeliczeniu na substancję organiczną gleby porównują procesy biologiczne zachodzące w dużych objętościach gleb mineralnych z małymi objętościami gleb torfowych.

Autor wychodzi z założenia, że ilość drobnoustrojów oraz przejawy aktywności biologicznej są zależne przede wszystkim od objętości, a nie od ciężaru gleby. Dlatego też proponuje stosowanie metody objętościowej (która uwzględnia wyłącznie równą objętość) jako jedynie racjonalnej.

N. Balicka

WPŁYW STOPNIA WILGOTNOŚCI GLEBY W MOMENCIE JEJ UPRAWY NA WŁASNOŚCI FIZYCZNE I MIKROFLORĘ

ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ВЛАЖНОСТИ ПОЧВЫ ВО ВРЕМЯ ОБРАБОТКИ НА ЕЕ ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И МИКРОФЛОРУ

THE INFLUENCE OF THE HUMIDITY OF THE SOIL IN THE MOMENT OF ITS TILLAGE UPON THE PHYSICAL PROPERTIES OF THE SOIL AND ITS MICROFLORA

Z Zakładu Uprawy Roli i Roślin W.S.R. we Wrocławiu

Struktura gleby zależy w dużym stopniu od wilgotności w momencie wykonania uprawy. Uprawa przeprowadzona przy wilgotności optymalnej dla danej gleby pozwala na uzyskanie struktury charakteryzującej się dobrymi własnościami fizycznymi, przy których zachodzi też intensywny rozwój mikroflory oraz uzyskuje się wysokie plony.

Przeprowadzono dwa doświadczenia polowe na dwóch różnych typach gleb: madzie chudej i madzie silnie spiaszczonej. Uprawę wykonano przy trzech wilgotnościach gleby: 1) mniejszej od optymalnej, 2) bliskiej optymalnej, 3) większej od optymalnej. Uzyskano w ten sposób trzy odmienne struktury badanej gleby, różniące się pomiędzy sobą własnościami fizycznymi, stopniem zgruźlenia oraz ilością mikroflory. W danym doświadczeniu liczniejsza mikroflora odpowiadała większej porowatości i przewiewności gleby. Korelacji między ilością drobnoustrojów a ilością i rozmiarami gruzełków nie znaleziono, chociaż nie można uważać tego za pewnik.

Granice optymalnej wilgotności w glebach cięższych są węższe. Tym można tłumaczyć, że różnice w strukturze i innych własnościach mady cięższej były wyraźniejsze niż na spiaszczonej, gdzie były mało wyraźne, a na plonach roślin w ogóle się nie ujawniły.

Z. Kanicka, K. Kendrzeńska, S. Mass, E. Piotrowska, H. Tomczyk i Z. Wolnicka

BADANIA WÓD STUDZIENNYCH NA TERENIE M. ŁODZI

ИССЛЕДОВАНИЯ ВОДЫ В КОЛОДЦАХ ГОРОДА ЛОДЗИ

BACTERIOLOGICAL EXAMINATIONS OF THE SPRING-WATER IN ŁÓDŹ

Z Zakładu Fizjologii Roślin (Pracownia Mikrobiologiczna) U.Ł. w Łodzi

M. Łódź przed wojną znajdowało się pod względem sanitarnym w stanie wielkiego upośledzenia, szczególnie jego dzielnica północna.

Dzielnica ta, silnie zabudowana, z siecią kanalizacyjną i wodociągową ledwie zapoczątkowaną, b. gęsto zamieszkała przeważnie przez ludność biedną, bezrobotną — stanowiła znakomite endemiczne podłoże dla takich chorób, jak tyfus brzuszny, czerwonka.

Po wojnie obraz ten się zmienił w dużym stopniu na korzyść. Dużo starych domów zostało zburzonych, powstały na ich miejscu nowe, racjonalne, sieć kanalizacyjna i wodociągowa uległa stopniowej rozbudowie, a wreszcie zastosowano masowe szczepienia przeciwtyfusowe. Wszystko to wpłynęło na wybitną poprawę warunków higienicznych.

Pomimo tych osiągnięć było rzeczą ciekawą zbadać, jak przedstawiają się pod względem zdrowotnym stosunki wodne.

W 1952 r. Zakład Mikrobiologii Ogólnej U.Ł. w porozumieniu z nowopowstałą Stacją San.-Epid. w Łodzi przeprowadził głównie w północnej, ale także i w blisko sąsiadujących dzielnicach badanie wody z 33 studni.

Badania każdej studni przeprowadzane były dwukrotnie: zimą (grudzień 1951 r.) i wiosną (kwiecień, maj 1952 r.).

Badania te obejmowały: stwierdzenie rodzaju studni (kopana czy wiercona), położenie studni w stosunku do miejsc, które mogły być źródłem zanieczyszczenia (śmietniki, ustępy), obudowy samej studni, sposobu czerpania wody (wiadro, pompa), głębokości studni.

Analiza fizyczna wody dotyczyła takich własności jak: przezroczystość, zabarwienie, smak, zapach, a dalej — temperatura i pH wody.

Analiza chemiczna miała za zadanie zbadanie ewentualnej obecności NH_3, NO_2, NO_3, Cl, SO_4^{--}, substancji organicznych i innych danych.

Pod względem mikrobiologicznym określano ogólną ilość drobnoustrojów na podłożu agar + + bulion, bakterii proteolitycznych — na podłożu żelatyna + pepton, a głównie chodziło o wyodrębnienie pałeczki okrężnicy, zróżnicowanie jej na typ jelitowy i ziemny podług ogólnie przyjętego schematu: podłoże Eijkmana, Endo, Simonsa, odczyn Voges-Proskauera oraz reakcja z czerwienią metylową.

Wyniki tych badań ujmujemy w krótkiej tabelce.

Ilość studni zbadanych	33,	
w tym studni kopanych	16, co stanowi	48,4%
studni wierconych	17, co stanowi	51,6%
Ogólna ilość studni zakażonych, z wodą złą lub podejrzaną	16, co stanowi	48,4%
Ogólna ilość studni zakażonych *E. coli*	11, co stanowi	33,3%
Wśród 16 studni kopanych:		
o wodzie złej lub podejrzanej było.	13, co stanowi	81,2%
w tym o wodzie zakażonej *E. coli*	9, co stanowi	56,3%
Wśród 17 studni wierconych:		
o wodzie złej lub podejrzanej było.	3, co stanowi	17,7%
w tym o wodzie zakażonej *E. coli*	2, co stanowi	11,7%

Z zestawienia tego widzimy, że stan zdrowotny wód pitnych na terenie badanym przedstawia się niepomyślnie: około połowy studni posiada wodę złą albo podejrzaną. Szczególnie studnie kopane, o głębokości 8 do 20 metrów, są niebezpieczne pod względem zdrowotnym.

Studnie wiercone o głębokości 40 60 90 metrów dostarczają wodę stosunkowo znacznie lepszą.

Na jakość wód w studniach kopanych wywiera wpływ niekorzystny zarówno pora roku (wiosna), jak również bliskość rzeki Łódki.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

A. Timler, K. Ogrodowczyk i Z. Ońko

BADANIA FIZYKO-CHEMICZNE I MIKROBIOLOGICZNE WÓD RZEKI ŁÓDKI

ФИЗИКОХИМИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОДЫ РЕКИ ЛОДКИ

CHEMICAL AND BACTERIOLOGICAL EXAMINATION OF THE WATER IN BROOKLET ŁÓDKA

Z Zakładu Fizjologii Roślin (Pracownia Mikrobiologiczna) U.Ł. w Łodzi

Odprowadzanie wód ściekowych w Łodzi odbywa się przy pomocy rowu, który bierze początek w północno-wschodniej części miasta, a jako już „rzeka" Łódka wlewa się do Neru, przepływającego na południe od miasta.

Początkowo Łódka jest zwykłym odkrytym rowem; od rogu ul. Kilińskiego i Północnej płynie zamkniętym kanałem pod miastem aż do przecięcia się ulic Srebrzyńskiej i Dra Michałowicza, a stąd już otwartym, obetonowanym korytem przepływa przez miasto i wreszcie, znowu przechodząc w zwykły rów, wlewa się do rzeki Neru. Na wysokości parku „Zdrowie" wpada do Łódki jej dopływ Bałutka — zresztą ściek tegoż charakteru co i Łódka; ponadto w całym swym biegu Łódka wchłania bardzo liczne ścieki zarówno gospodarcze, jak i ścieki różnorodnych zakładów przemysłowych — przędzalni, farbiarni, garbarni, rzeźni, szpitali i wielu innych zakładów.

Pierwsze i jedynie opublikowane badania rzeki Łódki pod względem chemicznym i sanitarnym zostały przeprowadzone w r. 1886 przez Fuchsa i Knichowieckiego. W pięćdziesiąt lat później (1937/8) Komitet Oczyszczania Ścieków przeprowadził badania chemiczne wód Łódki, ale wyników nie opublikował.

Z zestawienia wyników tych badań widać, że kanał ten ulega coraz większemu zanieczyszczeniu.

W roku 1886 — sucha pozostałość wynosiła 111—460 mg/l.

W roku 1937/8 — sucha pozostałość wynosiła już 1253—1663 mg/l.

W roku 1952 Pracownia Mikrobiologiczna przy Katedrze Fizjologii Roślin U. Ł. łącznie z Pracownią Badań i Technologii Ścieków Wojew. St. Sanit.-Epidemiologicznej w Łodzi podjęły badania fizyko-chemiczne i mikrobiologiczne wód Łódki. Część fizyczna i chemiczna badań była prowadzona pod opieką mgra A. Timlera, strona mikrobiologiczna — pod kierunkiem prof. W. Moychy.

W komunikacie niniejszym podajemy tylko część doświadczeń przeprowadzonych nad wodami rzeki Łódki, a ponadto także tylko część eksperymentalnych danych uzyskiwanych przy każdorazowym badaniu.

Badania przeprowadzone były dwukrotnie: w miesiącu maju i czerwcu r. ub. i dotyczyły kilku (7) miejsc przebiegu rzeki. Tu podajemy tylko dwa stanowiska, a mianowicie: 1 — na wysokości parku „Zdrowie" w odległości około 200 m po zlaniu się Bałutki z Łódką; 2 — u ujścia Łódki do Neru.

Analiza fizyko-chemiczna jakościowa i ilościowa prowadzona była podług „Ujednostajnionych metod chemicznego badania wody" (B. Szniolis i J. Just), a mikrobiologiczna — podług metod stosowanych przez P.Z.H. do wód ściekowych.

Tablica I

Wyniki badań chemicznych rzeki Łódki

Результаты химических исследований воды р. Лодки

Chemical analysis of water in brooklet Łódka

Miejsce badania wody		Góra rzeki po połączeniu się Bałutki z Łódką		Dół rzeki przy ujściu Łódki do Neru	
Okres		Maj	Czerwiec	Maj	Czerwiec
Ilość siarczanów	mg/l	185,7	223,6	184,8	111,0
„ siarkowodoru	mg/l	3,9	—	—	—
Azotu organicznego	mg/l	428,0	13,3	4,7	15,4
„ amonowego	mg/l	67,2	2,8	2,8	0,7
„ azotynowego	mg/l	0,07	0,4	0,5	1,0
„ azotanowego	mg/l	0,01	0,5	1,0	0,2
Chlorków	mg/l	270,0	90,0	80,0	95,0
Utlenialność	mg/l	1270,0	70,0	87,0	50,0
Sucha pozostałość	mg/l	1344,0	978,0	678,0	546,0
Strątu przy prażeniu	mg/l	372,0	218,0	166,0	208,0

Porównując wyniki analizy wody w górnym i w dolnym biegu rzeki, stwierdzić można wyraźne zmniejszenie zanieczyszczenia wody Łódki u jej ujścia.

Tablica II

Wyniki badań bakteriologicznych rzeki Łódki

Результаты бактериологических исследований воды р. Лодки

Microflora of the water in brooklet Łódka

Miejsce badania wody	Ilość bakterii w 1 ml wody (metoda płytkowa)			
	Góra rzeki (po zlaniu się Bałutki z Łódką)		Dół rzeki (u ujścia Łódki do Neru)	
Okres	Maj	Czerwiec	Maj	Czerwiec
na agarze	1.900.000	2.500.000	2.700	50.000
na żelatynie	1.500.000	2.000.000	4.200	100.000
na Endo	1.150.000	2.200.000	2.300	30.000
na poż. Simonsa	170.000	1.450.000	1.500	10.000
miano *coli*	10^{-12}	10^{-6}	nieoznacz.	10^{-3}

Badania mikrobiologiczne

Badania te przeprowadzane były jednocześnie z chemicznymi, w tychże samych miejscach rzeki i obejmowały następujące zagadnienia: 1) określenie ilości drobnoustrojów w 1 ml badanej wody, 2) określenie charakteru drobnoustrojów w badanej wodzie, 3) stwierdzenie obecności pałeczek okrężnicy, 4) rozróżnienie typu jelitowego i ziemnego pałeczki okrężnicy, 5) oznaczenie miana *coli* i 6) abiotyczność wody rzeki Łódki.

Pomimo charakteru wybitnie ściekowego wody rzeki Łódki, przynajmniej w jej górnych odcinkach, nie mają charakteru bakteriobójczego. Można było stwierdzić ilościowo, że mikroflora „naturalna" tych wód rozwija się w ciągu pierwszych 2—3 dni. Podobnie woda rzeki, przesączona przez świece Chamberlanda i zakażona określonymi hodowlami bakterii, nie wykazuje zaniku bakterii w pierwszych 2—3 dniach.

M. Morzycka i H. Wysoczyńska

PORÓWNANIE METODY FERMENTACYJNEJ I FILTRACYJNEJ OKREŚLANIA MIANA *COLI* W WODZIE Z ZASTOSOWANIEM BŁON FILTRACYJNYCH WŁASNEJ PRODUKCJI

СОПОСТАВЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАЦИОННОЙ И ФИЛЬТРАЦИОННОЙ МЕТОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ *E. COLI* В ВОДЕ ПРИ ПОМОЩИ ФИЛЬТРОВАЛЬНЫХ ПЛЕНОК СОБСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ

THE COMPARISON OF THE RESULTS OBTAINED BY DETERMINING „*COLI-INDEX*" BY FERMENTATION AND GRADOCOL-FILTRATION-METHOD

Celem pracy było porównanie metody filtracyjnej oznaczania miana *coli* w wodzie z metodą fermentacyjną powszechnie używaną.

Przebadano obiema metodami około stu próbek stwierdzając, że wyniki są zgodne.

Metoda filtracyjna skraca czas badania i umożliwia badanie na niewielkiej ilości pożywki dużych ilości wody.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

E. Czerwińska, I. Sadurska i D. Kozłowska

PROMIENIOWCE NISZCZĄCE PAPIER ZABYTKOWY

Z Zakładu Fizjologii Roślin i Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego

Enzymatyczny rozkład celulozy jest bardzo ważnym procesem z punktu widzenia biologicznego. Zniszczenia wywołane mikrobiologicznym rozkładem błonnika w przemyśle drzewnym, papierniczym, włókienniczym i innych skłoniły do większego zainteresowania się tym tematem.

W pracowni mikrobiologicznej Zakładu Związków Toksycznych Instytutu Barwników i Półproduktów w cyklu badań nad hydrolitycznym rozkładem błonnika wyodrębniono szereg promieniowców.

Poszczególne szczepy izolowano z papierów zabytkowych, pochodzących z różnych okresów, metodą podaną przez Kowalika (1952).

Opisano wzrost na następujących podłożach: a) płynnej, zmodyfikowanej pożywce Greathouse (1950) (zamiast NH_4NO_3 użyto $NaNO_3$), b) ziemniaku, c) marchwi, d) agarze bulionowym, e) agarze bulionowym z glukozą, f) sześciu aminokwasach (fenyloalanina, glikokol, alanina, izoleucyna, kwas glutaminowy, asparagina) i 2 alkoholach (glicerol, mannitol). Badano zdolność barwienia metodą Grama oraz wielkość konidii. Badanie wykorzystania różnych związków jako źródła N przeprowadzono na płynnej pożywce Greathouse, zastępując NH_4NO_3 badanym związkiem azotowym, z uwzględnieniem równoważnej ilości N w NH_4NO_3. Jako źródło C używano bibułę do sączenia Munktellsa N OB z ilością popiołu 0,00024 g; wykorzystanie aminokwasów jako jedynego źródła C i N badano na płynnej pożywce Greathouse, dodając zamiast NH_4NO_3 i bibuły 0,1% aminokwasu. Własności proteolityczne sprawdzono na peptonie, mleku i żelatynie. Stosując zmodyfikowaną pożywkę Greathouse zbadano zdolność do wykorzystania różnych źródeł C: glukozy, sacharozy, mannitolu, d-glicerolu i laktozy. Określono przy tym optymalne stężenie glukozy i sacharozy. Z wielocukrów do badań użyto skrobię i celulozę. Stosując metodę Vincent (1947) zbadano wartość toksyczną anilidu kwasu salicylowego, dwumetylodwutiokarbaminianu cynku i p-chloro-m-krezolu. Sprawdzono także wpływ tlenku etylenu, poddając badane szczepy działaniu gazu złożonego z tlenku etylenu i dwutlenku węgla (w stosunku 10: 90) w komorze próżniowej (Phillips — 1952, Prescott, Dunn — 1949).

Ze względu na brak miejsca podano tylko opis hodowli na pożywce Greathouse (zmodyfikowanej) z paskami bibuły. Nie zamieszczono również tablic i wykresów.

Szczep 53. Grzybnia powietrzna mączysta, białoszara. Grzybnia w podłożu (bibuła do sączenia) żółta. Wzrost głębinowy w postaci bezbarwnych kłaczków. Wielkość zarodników $0,8 \times 1,6\,\mu$.

Szczep 313. Drobne pojedyncze, szare kolonie. Wielkość zarodników $1,8 \times 2,8\,\mu$.

Szczep 241. Grzybnia powietrzna mączysta, brązowożółta. Na pograniczu z pożywką płynną silne wydzielanie kropli płynu na powierzchni grzybni. Grzybnia w podłożu cytrynowożółta. Wzrost głębinowy w postaci bezbarwnych kłaczków. Wielkość zarodników 1,2 × 1,9 μ.

Szczep 133. Grzybnia powietrzna wełnista, zielonkawoszara. Grzybnia w podłożu zielonkawoszara. Wzrost głębinowy w postaci bezbarwnych kłaczków Wielkość zarodników 1,6 × 2,4 μ.

Szczep 177. Grzybnia powietrzna aksamitna, zielonkawoczarna, przy zetknięciu bibuły z płynem daje metaliczny połysk. Grzybnia w podłożu zielonkawoczarna, intensywniejsza. W głębi kłaczki oliwkowozielone. Wielkość zarodników 1,9 × 2,8 μ (fot. 1*.)

Szczep 219. Grzybnia powietrzna jasno-żółto-czerwona, aksamitna. Na powierzchni wydziela krople płynu. Grzybnia w podłożu jasnożółta do zielonkawej. W głębi pożywki grzybnia swobodnie pływa w postaci kłaczków. Wielkość zarodników 1,2 × 1,6 μ (fot. 2).

Szczep 24. Grzybnia powietrzna czerwonawofioletowa, aksamitna. Grzybnia w podłożu czerwonawofioletowa, intensywniej zabarwiona. Wzrost głębinowy w postaci oddzielnych szarych kolonii. Wielkość zarodników 1,9 × 2,8 μ.

Szczep 165. Grzybnia powietrzna czerwonawoszara, pylista. Grzybnia w podłożu jasnożółta. Wzrost głębinowy słaby w postaci bezbarwnych kłaczków. Wielkość zarodników 1,6 × 2,4 μ (fot. 3).

Szczep 82. Grzybnia powietrzna aksamitna, jasno-żółto-czerwona. Wydziela krople płynu. Grzybnia w podłożu jasnocytrynowa. Wzrost głębinowy w postaci bezbarwnych kłaczków. Wielkość zarodników 1,9 × 2,8 μ.

Szczep 246. Grzybnia pylista, zielonkawoszara. Grzybnia w podłożu od fioletowej do oliwkowozielonej. W głębi pożywki bibuła zabarwiona na zielony kolor. Wzrost głębinowy w postaci bezbarwnych kłaczków. Wielkość zarodników 2,8 × 1,8 μ (fot. 4).

Szczep 181. Grzybnia powietrzna wełnista, srebrnobiała. Grzybnia w podłożu zielonkawoszara. Wzrost głębinowy w postaci bezbarwnych kłaczków. Wielkość zarodników 1,2 × 1,9 μ.

Szczep 243. Grzybnia powietrzna wełnista, zielonkawoszara. Grzybnia w podłożu od bezbarwnej do żółtej przy zetknięciu bibuły z płynem. Wielkość zarodników 0,8 × 1,6 μ (fot. 5).

Szczep 2. Grzybnia powietrzna popielata, wełnista. Grzybnia w podłożu popielata. Na granicy z płynem barwi bibułę na kolor jasnocytrynowy. Wzrost głębinowy w postaci bezbarwnych kłaczków. Wielkość zarodników 0,8 × 1,6 μ (fot. 6).

Wszystkie szczepy barwiły się gramdodatnio.

Badając intensywność wzrostu w zależności od pH ustalono, że przy użyciu płynnej zmodyfikowanej pożywki Greathouse z paskami bibuły optimum pH leży w granicach 4—6. Zaobserwowano wyraźną tolerancję środowiska kwaśnego. Przy pH 8 tylko 7 szczepów wykazało wzrost, a przy pH 9 rósł tylko 1 szczep.

Najlepszym źródłem N dla badanych szczepów był pepton i asparagina, co zgadza się z danymi z literatury (Cochrane i Conn 1947, Krainsky 1914, Waksman 1945), a ze związków nieorganicznych dla 9 szczepów $NaNO_3$, dla pozostałych zaś $NH_4H_2PO_4$.

* Fotografie zamieszczono na tablicy V i VI.

Aminokwasy użyte jako jedyne źródło C i N były wykorzystywane przez badane promieniowce bardzo słabo. Dodanie do pożywki 0,25% glukozy potęgowało wzrost niektórych szczepów nawet czterokrotnie. Z badania proteolitycznych własności promieniowców wynika, że pepton jest odpowiednim źródłem C i N. Wszystkie szczepy rozpuszczały żelatynę. Z 13 przebadanych organizmów 8 peptonizowało mleko. Najodpowiedniejszym źródłem C dla 12 szczepów był mannitol, a następnie glukoza, sacharoza i glicerol. Szczep 313 najlepiej wykorzystywał glicerol. Laktoza była bardzo słabo wykorzystywana i tylko przez 7 szczepów. Wyniki nasze zgadzają się z danymi z literatury (K r a i n s k y — 1914, W a k s m a n — 1945). 0,25% glukozy i sacharozy stanowi optymalne stężenie dla wzrostu badanych szczepów. Własności diastatyczne, oprócz szczepu 24, posiadały wszystkie szczepy użyte do doświadczeń.

Procent rozkładu celulozy w przeciągu 21 dni przez poszczególne szczepy jest różny i waha się w granicach 15,3—79,6%, w zależności od szczepu.

Stężenie 0,005% anilidu kwasu salicylowego było dawką hamującą całkowicie wzrost 13 szczepów, zaś 0,0025% — tylko 8. Zabójcza dawka dwumetylodwutiokarbaminianu cynku waha się w granicach 0,0045—0,06%, w zależności od użytego szczepu; 0,005% p-chloro-m-krezolu było dawką zabójczą dla 12 szczepów, dla jednego zaś już 0,0025%. Z 13 szczepów poddanych działaniu tlenku etylenu tylko jeden wykazywał wzrost po przesianiu na pożywkę.

DYSKUSJA

Wzmianki w literaturze co do niszczenia papieru przez promieniowce dotyczą tylko organizmu *Nocardia*, opisanego przez S é é ' g o (1919), oraz kilku szczepów opisanych przez V e r o n a i B a l d a c c i e g o (1939). Otrzymane wyniki co do wykorzystania źródeł azotu zgadzają się z danymi z literatury. Jednak na podstawie naszych badań nie można określić najlepszego źródła N, gdyż nie ustalono optymalnego pH dla poszczególnych źródeł N. Przy stosowaniu związków o składzie NH_4R następowało prawdopodobnie intensywniejsze pobieranie jonu NH_4 niż reszty kwasowej. W wyniku tego podłoże ulegało zakwaszeniu i to prawdopodobnie było przyczyną słabego wzrostu promieniowców. Słaby wzrost promieniowców przy użyciu NH_4NO_3 był wywołany prawdopodobnie zakwaszeniem środowiska, gdyż organizmy, mając do wyboru NH^+_4 i NO^-_3, najpierw zużywają grupę NH_4 a dopiero po jej całkowitym zużyciu — grupę NO_3 (F o s t e r, 1949). Dane z literatury, podając optymalne pH wzrostu, nie zawsze uwzględniają stosowane źródło azotu (C o c h r a n e i C o n n — 1947, W a k s m a n — 1945).

Słaby wzrost przy dodaniu aminokwasów do podłóż wywołany był prawdopodobnie nieodpowiednim stężeniem C. Na skutek braku czystych aminokwasów nie uwzględniono odpowiedniej koncentracji zarówno C, jak i N.

Energię zużycia błonnika, podobnie jak i w innych pracach, badano na bibule, a zatem na celulozie strąconej. Dlatego na podstawie otrzymanych wyników nie można stwierdzić obecności enzymu C_1 (L e v i n s o n, M a n d e l s i R e e s e — 1951, P o c h o n i B ä y — 1951) i zaliczyć je do właściwych rozpuszczających błonnik organizmów.

Środki grzybobójcze, stosowane do ochrony papieru i bawełny, działają na badane szczepy w dawkach niższych niż na grzyby. Działanie tych związków jest specyficzne (H o r s f a l l — 1945, S m i t h — 1947). Nasuwa się zatem wniosek, aby dla zabezpieczenia papieru przed atakiem mikroorganizmów stosować mieszaniny związków z uwzględnieniem warunków wilgotności. W dalszej pracy należałoby przeprowadzić badania z solami metali ciężkich, a zwłaszcza z solami żelazo-

wymi, występującymi we włóknach papieru i wpływającymi pobudzająco na wzrost mikroorganizmów. Oprócz tego sole żelazowe powodują rdzewienie papieru (Beckwith, Swanson i Iiams — 1940).

Tlenek etylenu stosuje się do dezynsekcji zbiorów archiwalnych i muzealnych, dlatego wydawało nam się celowe zbadanie wpływu tego związku na mikroorganizmy niszczące papier. Pozytywny wynik przypisujemy nie tylko działaniu samego tlenku etylenu, ale i próżni, pod wpływem której następuje odwodnienie plazmy.

Profesorowi drowi Kazimierzowi Bassalikowi, pod którego kierunkiem wykonano niniejszą pracę, składamy serdeczne podziękowanie za cenne rady i wskazówki.

Е. Червинска, И. Садурска и Д. Козловска

АКТИНОМИЦЕТЫ РАЗРУШАЮЩИЕ СТАРИННЫЕ КНИГИ И РУКОПИСИ

Резюме

Из старинных книг и рукописей авторами выделено 13 штаммов актиномицетов, затем описаны их морфологические свойства (фот. 1—5), а также изучены их физиологические свойства.

Установлено, что:

1) наилучшими источниками N для исследуемых штаммов является: пептон, аминокислоты и $NaNO_3$, а для нескольких штаммов — $NH_4H_2PO_4$;

2) оптимальное значение pH при употреблении в среде Гретхауза $NaNO_3$ вместо NH_4NO_3 колеблется в границах от 4 до 6 в зависимости от штамма;

3) хорошими источниками C являются: маннитол, сахароза, глюкоза, глицерол, осажденная из раствора целлюлеза и крахмал (штамм Нр. 24 не гидролизирует крахмала);

4) соответственной концентрацией для глюкозы является 0,25%-ая концентрация;

5) исследованные актиномицеты содержат энзим C_x;

6) бактериоцидной дозой для актиномицетов являются концентрации: анилида салициловой кислоты — 0,005%, диметилодитиокарбаминового цинка — 0,06%, р- хлоро-м--крезола — 0,005%;

7) окись этилена смешанный с углекислотой в вакуумкамере действует убийственно.

E. Czerwińska, I. Sadurska and D. Kozłowska

ACTINOMYCETES DAMAGING OLD MANUSCRIPTS AND DOCUMENTS

Summary

There were isolated 13 strains of *Actinomycetes* from old documents and manuscripts.

The authors examined morphology (Fig. 1—5) and physiological characteristics of these strains.

It was shown that:

1) pepton, amino acids and $NaNO_3$ may be used as a source of a nitrogen. Some of the strains grew on $NH_4H_2PO_4$ as a sole source of nitrogen;

2) the optimal acidity in the Greathouse's medium (with $NaNO_3$ instead of NH_4NO_3) was pH 4,0 to 6,0;

3) mannitol, saccharose, glucose, glicerol, cellulose and starch were available to investigated actinomyces as sole sources of carbon (strain No 24 was not able to use starch);

4) the best growth was observed in media with glucose in concentration of 0,25%;

5) it was found that investigated strains produced enzyme C_x;

6) following substances were shown to possess bactericidal action against tested actinomyces: anilide of salicylic acid in concentrations 0,005%, zinc dimethyldithiocarbamate — 0,6%, p-chlor-m-cresol — 0,005%;

7) ethylene oxide in the vacuum-camera destroys investigated actinomyces.

LITERATURA

1. Beckwith T. D., Swanson W. H., and Iiams T. M., 1940: Deterioration of paper, Berkeley. University of California Press.
2. Cochrane V. W., and Conn H., 1947: The growth and pigmentation of *Actinomyces coelicolor* as affected by cultural conditions. *J. Bact.*, **54**: 213.
3. Foster J. W., 1949: Chemical activities of fungi. New-York. Academic Press Inc. Publishers.
4. Greathouse A. G., 1950: Microbiological degradation of cellulose. *Text. Res. J.* **20**:217.
5. Horsfall J. G., 1945: Fungicides and their action. Waltham, Chronica Botanica Co.
6. Kowalik R., 1952: Mikroorganizmy niszczące papier zabytkowy. *Prace placówek Nauk.-Bad. Min. Przem. Chem.* **2**:49.
7. Krainsky A. 1914: Die Aktinomyceten und ihre Bedeutung in der Natur. *Centr. f. Bakt.*, Abt. II. **42**: 662.
8. Levinson H. S., Mandels G. R., and Reese E. T., 1951: Products of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Arch. Biol. Bioph.*, **31**:351.
9. Phillips R. C., 1952: Symposium on the biology of bacterial spores. *Bact. Rev.* **16**:135.
10. Prescott S. C. and Dunn G. G., 1949: Industrial microbiology, New-York. The Mc Graw, Hill Book Co.
11. Pochon J. et Bäy M., 1951: La cellulolyse bactérienne. Importance des techniques pour son étude. *Ann. Inst. Pasteur.* **81**:179.
12. Sée P., 1919: Les maladies du papier pique, Paris. O. Doin.
13. Smith G., 1947: An Introduction to industrial mycology, London, Edward Arnold and Co.
14. Verona O., Baldacci E., 1939: Isolamento di Schizomiceti cellulositici, Attinomiceti Eumiceti, dall intestino delle Termiti e ricerche sull attivita cellulositica degli Attinomiceti *Mycopathologia*, **2**;1930.
15. Vincent, 1947: The esters of 4-hydroxybenzoic acid and related compounds. Methods for the study of their fungistatic properties, *J. Soc. Chem. Ind.*, **66**:149.
16. Waksman S. A., 1945: The Actinomycets. Waltham. Chronica Botanica Co.

K. Kluczycki

BIOLOGICZNA ODPORNOŚĆ STOSOWANYCH IZOLACJI ASFALTOWYCH. KRÓTKA METODA KLOCKOWA BADANIA WARTOŚCI GRZYBOBÓJCZEJ (TOKSYCZNOŚCI) ŚRODKÓW KONSERWUJĄCYCH DREWNO

Z Zakładu Technologii Chem. Przem. Roln. i Mikrobiologii Techn. Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Opublikowano w *Acta Microbiologica Polonica*, Vol. I, nr. 3. 1952

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

L. Ogielski, A. Skurski i K. Sylwestrówna

OBRAZ MIKROSKOPOWY FLORY BAKTERYJNEJ PROCESU GNILNEGO MIĘSA ZACHODZĄCEGO W WARUNKACH TLENOWYCH

Z Zakładu Higieny Produktów Zwierzęcych i z Zakładu Mikrobiologii Wydz. Wet. W.S.R. we Wrocławiu

Proces gnilny tkanki mięsnej rozpada się zasadniczo na dwa rodzaje, a mianowicie na proces gnilny powierzchniowy i głęboki. Pierwszy powodowany jest przez drobnoustroje, które z powietrza i w czasie obróbki dostają się na powierzchnię mięsa. Najsilniejszej inwazji w tym procesie ulegają powierzchnie przekroju mięśni, najsłabszej — wysuszone powięzie i tkanka tłuszczowa. W tak zwanym gniciu powierzchniowym biorą udział w przeważającej ilości drobnoustroje z grupy *Proteus*, *subtilis*, ziarniaki, pleśnie i drożdżaki. W ogólności należy stwierdzić, że flora gnilna, biorąca udział w procesie gnilnym powierzchniowym, jest bardzo mieszana.

Celem niniejszej pracy jest zbadanie przebiegu procesu gnilnego powierzchniowego począwszy od jego fazy wstępnej, a skończywszy na całkowitym rozkładzie tkanki mięsnej.

Poddawano badaniu mięso pochodzące ze sztuk zdrowych, pobrane bezpośrednio po uboju. Codziennie obserwowano proces gnilny, rozwijający się na powierzchni badanego mięsa. Zdejmowano powstały nalot przez wytrząsanie próbek w 20 ml NaCl. Z uzyskanej w ten sposób zawiesiny sporządzano preparaty mazane i po zabarwieniu metodą Grama obliczano stosunek drobnoustrojów gramdodatnich do gramujemnych w ściśle określonej ilości pól widzenia. Pozostałą część zawiesiny użyto do pomiarów pH i ilości wolnego azotu pozabiałkowego, określanego przy pomocy fotokolorymetru Langego, po uprzednim odbiałczeniu metodą Folina. Badania przeprowadzano w pięciu seriach, używając jako próbek mięsa wołowego.

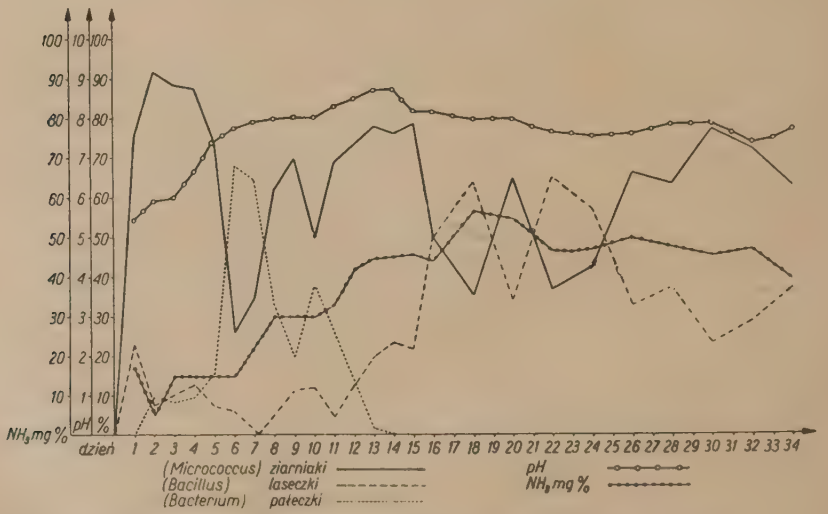
Z przeprowadzonych badań wynika, że pomimo tego, iż flora powietrza opadająca na powierzchnię mięsa i powodująca gnicie zewnętrzne jest bardzo mieszana, to jednak zachowanie się poszczególnych gatunków w trakcie procesu gnilnego jest odmienne. Przez cały okres procesu gnilnego dominują ziarenkowce. Ani odczyn zasadowy środowiska, ani też obecność większej ilości wolnego azotu pozabiałkowego nie wpływa na nie hamująco. Obserwując zewnętrzny proces gnilny w obrazie mikroskopowym, można było stwierdzić fazy wielkiego wzrostu i spadku ilości ziarenkowców, powtarzające się co dwa lub trzy dni. Nieco odmiennie zachowują się pałeczki gramujemne. Te w pierwszych dniach, chociaż opadły na powierzchnię równocześnie z ziarenkowcami, rosną bardzo słabo. Dopiero gdy krzywa pH osiągnie wartość od 7,6 do 8,0, następuje optimum ich wzrostu z równoczesnym spadkiem ilości ziarniaków. Po tym okresie, trwającym od dwóch do czterech dni, obser-

wować można spadek ilości pałeczek, tak że między 13 a 16 dniem znikają zupełnie z preparatów lub też utrzymują się w znikomych ilościach. Należy zaznaczyć, że krzywa pH wznosi się w trakcie procesu gnilnego do wartości około 8,6, a potem stopniowo opada do wartości 7,8. Mimo ponownego ustalenia się odczynu środowiska, podobnego jak przy optimum rozwoju pałeczek, te ostatnie nie są już w stanie rozwijać się intensywnie. Zniknięcie ich idzie w parze ze wzrostem krzywej wolnego azotu pozabiałkowego. Widoczne jest, że w środowisku o stężeniu azotu powyżej 45 mg% warunki ich rozwoju są bardzo nieodpowiednie.

Obserwowane laseczki zachowują się nieco odmiennie. Wzrost ich ilości idzie prawie równolegle do wzrostu krzywej azotu i optimum wzrostu przypada na okres ustalenia się krzywej pH. Na początku badanego procesu gnilnego pH miało wartość niską 5,5, w pierwszym lub drugim dniu stopniowo, w miarę procesu autolizy białka wywołanej przez drobnoustroje, wzrastało osiągając między 12 a 14 dniem wartość około 8,6. Po upływie tego czasu obserwować można było stopniowe obniżanie się wartości do około 7,5. Spadek krzywej można do pewnego stopnia wytłumaczyć stale zwiększającą się ilością siarkowodoru w mięsie.

Ogólnie stwierdzić można, obserwując ilość liczonych drobnoustrojów, że ich siła rozrodcza przy końcu procesu gnilnego jest słabsza aniżeli na początku.

Wyniki badań są przedstawione graficznie na wykresie (Rys. 1).



Rys. 1. Obraz mikroskopowy flory procesu gnilnego mięsa w warunkach tlenowych

Рис. 1. Микроскопическая картина микрофлоры гнилостного процесса говядины в аэробных условиях

Fig. 1. Changes of the microflora during aerobic putrefaction of meat

Zjawiska powyżej opisane odnoszą się do tak zwanego gnicia powierzchniowego lub zewnętrznego. Można było zaobserwować w trakcie badań pewien antagonizm między typami drobnoustrojów, a więc laseczek, pałeczek i ziarenkowców,

przy równoczesnej zmianie odczynu środowiska i wzrastającej stopniowo ilości azotu pozabiałkowego. Można to uważać za rodzaj biocenozy. Jeżeli chodzi o środki spożywcze, to podobny antagonizm obserwujemy i w mleku, gdzie po fazie wstępnej, charakteryzującej się brakiem względnie słabym przyrostem drobnoustrojów, obserwujemy fazę logarytmicznego wzrostu, a potem gwałtownego spadku. Po okresie zahamowania przychodzi okres rozwoju proteolitycznej flory, potem bakterii pseudomlekowych, bakterii mlekowych, drożdży i pleśni, a następnie wskutek spalenia kwasu przez drożdże i pleśnie następuje rozwój bakterii gnilnych. Naturalnie, że szybkość procesu zależy w dużej mierze od temperatury środowiska i od ilości wstępnej drobnoustrojów.

Analizując proces gnilny powierzchniowy w mięsie zwierząt rzeźnych, możemy go podzielić na podstawie mikroskopowego obrazu na kilka faz. Pierwsza faza to przypuszczalnie okres działania aleksyny, wyrażający się zahamowaniem wzrostu drobnoustrojów. Okres ten jest bardzo krótki i dotyczy jeszcze świeżego mięsau bezpośrednio po uboju. Potem przychodzi druga faza, w której następuje intensywny wzrost ziarniaków. Trzecia faza, na którą przypada dominacja pałeczek (5 — 6 dzień), czwarta faza ponownej dominacji ziarenkowców i stałego wolnego wzrostu laseczek. Na koniec piąta faza, nie uwidoczniona na wykresie, w które ilość ziarniaków maleje; pod koniec tej fazy stwierdza się przeważającą ilość laseczek gnilnych. Ostatnia faza została stwierdzona w mięsie, które było obserwowane przez okres 96 dni.

Л. Огельски, А. Скурски и К. Сильвестер

МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ КАРТИНА БАКТЕРИЙНОЙ ФЛОРЫ ГНИЛОСТНОГО ПРОЦЕССА МЯСА В АЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

Резюме

Авторы, исследуя поверхностный гнилостный процесс говядины, установили, что он происходит в нескольких фазах: первая — очень короткая, относящаяся к свежему мясу, отличается заторможением развития бактерий; вторая, в которой происходит интенсивное развитие кокков, третяя — с преобладанием палочек, что происходит на 5—6 день, четвертая — с вторичным преобладанием кокков и постепенным, медленным развитием бацилл. Наконец в пятой фазе происходит почти полная доминация бацилл.

L. Ogielski, A. Skurski and *K. Sylwestrówna*

BACTERIAL FLORA OF THE SUPERFICIAL AEROBIC MEAT PUTREFACTION

Summary

This report deals with microscopical research of bacterial flora during superficial putrefaction of beef in aerobic conditions. Five phases were distinguished in the putrefactive process: (I) distinct hindrance of development of microorganisms in fresh meat, (II) intense growth of micrococci, (III) prevalent advance in growth of the rods on the 5-th day of putrefaction, (IV) renewed intense growth of the micrococci and constant but slow growth of the sporeforming bacilli, (V) powerful domination of the sporeforming bacilli.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

E. Prost

BADANIA NAD ZASTOSOWANIEM ANTYBIOTYKÓW W PRODUKCJI KONSERW MIĘSNYCH

ПРИМЕНЕНИЕ АНТБИОТИКОВ В КАЧЕСТВЕ БАКТЕРИОЦИДНЫХ СРЕДСТВ В КОНСЕРВНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

SUITABILITY OF ANTIBIOTICS FOR PRESERVATION OF CANNED MEAT

Z Zakładu Higieny Środków Spożywczych Pochodzenia Zwierzęcego Uniwersytetu M.C.S. w Lublinie

Badania przeprowadzono nad gulaszem angielskim produkowanym w miejscowych Zakładach Mięsnych, pobieranym z przetwórni w stanie surowym tuż przed zapuszkowaniem. Próby przeprowadzono w probówkach, w których umieszczano około 4 g masy mięsnej i zalewano do 9,5 ml bulionem odżywczym. Następnie dodawano do każdej probówki 0,5 ml antybiotyku rozpuszczonego w jałowym płynie fizjologicznym. Otrzymywano w ten sposób różne stężenia antybiotyków. W celu otrzymania warunków beztlenowych zalewano probówki wyjałowioną płynną parafiną. Dla kontroli wzrostu przetrzymywano probówki w termostacie w temperaturze 37°.

Zastosowano następujące antybiotyki w różnych stężeniach: penicylina—0,1 j/ml, 10 j/ml, 20 j/ml, 100 j/ml, 200 j/ml, 1000 j/ml, streptomycyna — 1 : 500.000, 1 : 200.000, 1 : 100.000, 1 : 20.000, 1 : 4.000, 1 : 1000.

Penicylina + streptomycyna — stężenia: p—0,1 j/ml+str. 1 : 500.000, p—10 j/ml + str. 1 : 200.000 p—20 j/ml+str. 1 : 100.000, p—100 j/ml+str. 1 : 20.000, p—200 j/ml+str. 1 : 4.000, p—1000 j/ml + str. 1 : 1000.

Dla wyzyskania wszystkich czynników, które mogłyby wpłynąć korzystnie na konserwację gulaszu przy użyciu antybiotyków, zastosowano następującą metodę:

Próby bez zastosowania podgrzewania

1) gulasz z bulionem odżywczym + antybiotyk — zalanie płynną parafiną — wstawienie do termostatu (37°),

2) gulasz z bulionem odżywczym + antybiotyk — zalanie płynną parafiną — przetrzymanie przez 24 godz. w chłodni (+2°) — wstawienie do termostatu,

3) gulasz z bulionem odżywczym + antybiotyk — zastosowanie przez 24 godzin warunków tlenowych przez niezalewanie probówek parafiną, następnie dodanie parafiny — wstawienie do termostatu.

Próby z zastosowaniem podgrzewania

Probówki podgrzewano do temp. 97 — 100°, przy czym dla każdej z poniżej podanych prób zastosowano podgrzewanie przez 10, 20 i 30 minut.

4) gulasz z bulionem odżywczym + antybiotyk — zalanie płynną parafiną — podgrzanie — wstawienie do termostatu,

5) gulasz z bulionem odżywczym + antybiotyk — zalanie płynną parafiną — podgrzanie — przetrzymanie przez 24 godz. w chłodni (2°) — wstawienie do termostatu,

6) gulasz z bulionem odżywczym — zalanie płynną parafiną — przetrzymanie w chłodni przez 24 godz. — podgrzanie — wstawienie do termostatu,

7) gulasz z bulionem odżywczym + antybiotyk — zastosowanie przez 24 godz. warunków tlenowych przez niezalewanie parafiną — zalanie płynną parafiną — podgrzanie — wstawienie do termostatu.

Na każdą poszczególną próbę sporządzono dwie probówki z antybiotykiem oraz jedną kontrolną bez antybiotyku. Próby przetrzymywano w termostacie przez okres 3 tygodni. Kontrolę wyników przeprowadzano przez: 1) stałą obserwację probówek, zwracając uwagę na zmętnienie bulionu, 2) przesiewy kontrolne na probówki z bulionem odżywczym i następne zalanie ich płynną parafiną, 3) badanie organoleptyczne treści probówek po okresie 3 tygodni z równoczesnym badaniem mikroskopowym (barwienie met. Grama).

WYNIKI

Penicylina. — Próby bez zastosowania podgrzewania wypadły wszystkie ujemnie, tzn. we wszystkich probówkach wystąpił wzrost. Przetrzymywanie probówek w chłodni opóźniło tylko wzrost drobnoustrojów o około 24 godziny. Przy zastosowaniu podgrzewania otrzymano względnie dodatnie wyniki (brak wzrostu, brak procesu gnilnego przy stężeniach 1000 j/ml, 200 j/ml, 100 j/ml, 20 j/ml i 10 j/ml). Niektóre jednak próby wypadły i przy tych stężeniach ujemnie (wzrost, proces gnilny), aczkolwiek przy nieznacznym nasileniu procesu gnilnego masy mięsnej.

Streptomycyna: — wszystkie próby bez zastosowania podgrzewania wypadły ujemnie, podobnie jak przy penicylinie. Przy zastosowaniu podgrzewania otrzymano względnie dodatnie wyniki (brak wzrostu, brak procesu gnilnego) przy stężeniach: 1 : 1000, 1 : 4000, 1 : 20000. Podobnie jak przy penicylinie przy tych stężeniach streptomycyny, niektóre próby dały wyniki ujemne. Stężenie 1 : 100 000, 1 : 200 000 i 1 : 500 000 dały wyniki negatywne (wzrost i proces gnilny), jednak w dużo mniejszym nasileniu niż w probówkach kontrolnych bez antybiotyku.

Penicylina + streptomycyna. — Wszystkie próby bez zastosowania podgrzewania wypadły ujemnie (wzrost i proces gnilny). Przy zastosowaniu podgrzewania zdecydowanie dodatnie wyniki (brak wzrostu i brak procesu gnilnego we wszystkich probówkach z antybiotykami) otrzymano przy stężeniach:

pen. 1000 j/ml + str. 1 : 1000
pen. 200 j/ml + str. 1 : 4000
pen. 100 j/ml + str. 1 : 20000
pen. 20 j/ml + str. 1 : 100000
pen. 10 j/ml + str. 1 : 200000

Próby z zastosowaniem obu antybiotyków, przetrzymywane przez okres 75 dni, potwierdziły otrzymane wyniki.

Różne stosowane modyfikacje przeprowadzanych prób nie wykazały zasadniczo żadnych różnic w wynikach.

Przy licznych próbach określonych jako dodatnie (brak wzrostu, ujemny wynik końcowego badania organoleptycznego oraz mikroskopowego) obserwowano wzrost w probówkach z bulionem odżywczym, na który dokonano przesiewów pośrednich.

Wskazuje to na działanie bakteriostatyczne użytych antybiotyków w stosunku do drobnoustrojów beztlenowych, przy jednoczesnym braku oddziaływania na zarodniki. Utrzymywane stężenia antybiotyków w badanym środowisku mięsno-bulionowym nie dopuszczały przypuszczalnie do rozwinięcia się zarodników w formy wegetatywne i do wywołania procesów rozkładowych tkanki mięsnej. Wzrost w probówkach kontrolnych występował przypuszczalnie na skutek ustania działania antybiotyku.

Należałoby przyjąć w przetwórstwie jako normę tzw. jałowość handlową konserw, tj. dopuścić możliwość występowania w nich zarodników drobnoustrojów. Najważniejszym zagadnieniem trwałości konserw jest stworzenie takich warunków w konserwie, aby zarodniki nie były w stanie wykiełkować i wywołać procesów gnilnych. Użycie antybiotyków z równoczesnym podgrzewaniem konserw do temp. 97—100° spełnia to zadanie.

A. Trawiński

WPŁYW ZAKWASZENIA NA OBECNOŚĆ DROBNOUSTROJÓW W MIĘSIE

Z Zakładu Higieny Środków Spoż. Poch. Zwierz. U. M. C. S. w Lublinie

(Streszczenia nie nadesłano).

T. Zachorowski

MIKROFLORA DORSZY ZATOKI GDAŃSKIEJ

Z Państwowego Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej

Pracę wydrukowano w *Biuletynie Państwowego Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej* — vol. IV (4), 1952, str. 453.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

Fr. Czapliński

ZARODNIKUJĄCE DROBNOUSTROJE TLENOWE W KONSERWACH MIĘSNYCH

Z Państwowego Zakładu Higieny — Filia w Poznaniu
oraz
z Zakładu Mikrobiologii i Serologii Wydziału Weterynaryjnego W.S.G.W. w Warszawie

Celem pracy było:

1) ustalenie udziału zarodnikujących drobnoustrojów tlenowych w bakteryjnym zanieczyszczeniu konserw mięsnych,
2) przebadanie wpływu tych drobnoustrojów na jakość konserw,
3) zbadanie ewentualnych stosunków, zachodzących między występującymi w konserwach drobnoustrojami a właściwościami fizyko-chemicznymi tych konserw,
4) ustalenie wpływu wyników badań na ocenę przydatności konserw.

Przedmiotem badań były konserwy mięsne dostarczone do Zakładu bądź to w ramach kontroli nad artykułami żywności, bądź też przez przemysł konserwowy dla stwierdzenia jakości wyprodukowanych przetworów względnie — określenia stopnia ich trwałości.

Badane konserwy reprezentowały 32 najrozmaitsze asortymenty krajowej produkcji przemysłowej i 1 asortyment produkcji zagranicznej (1305 puszek). Czas produkcji dostarczanych do badań konserw przypadał na okres 1949 — 1952.

Konserwy po badaniach wstępnych poddawane były próbie termostatowej. Konserwy sterylizowane termostatowano początkowo przez 7 dni, jednak na skutek sugestyj przemysłu mięsnego okres ten przedłużono następnie do 10 dni.

Konserwy pasteryzowane, w zależności od formatu i wielkości puszek, termostatowano 3 do 5 dni.

Na podstawie zebranego materiału doświadczalnego stwierdzić należy, że okres 5 do 7 dni dla konserw sterylizowanych, a 3 dni dla konserw pasteryzowanych wystarcza dla poznania stosunków bakteriologicznych konserw.

Przedmiotem szczegółowej analizy, jako najbardziej typowe a zarazem najliczniej reprezentowane, były dwa typy konserw sterylizowanych, a mianowicie konserwy „405" wołowa i „414" wieprzowa.

Znamiennym zjawiskiem jest fakt, że konserwa wołowa wykazuje jałowość w 67,7%, gdy tymczasem w konserwie wieprzowej tylko 35,1% badanych konserw było jałowych. Drugim niemniej interesującym szczegółem jest ilość dodatnich preparatów bezpośrednich, a mianowicie 17,4% w konserwie wołowej i 45,8%

w konserwie wieprzowej. Świadczy to o bardzo dużych różnicach w zanieczyszczeniu surowca użytego do produkcji. Analiza przyczyn tego stanu rzeczy prowadzi do wniosku, że zanieczyszczenie surowca następuje, jeśli chodzi o trzodę chlewną, w głównej mierze już w czasie uboju. Prace prowadzone w tym zakresi przez Zawirską-Stefaniakową wykazały, że przy obecnie stosowanych metodach uboju zanieczyszczeniu bakteryjnemu ulegają tusze w 78,6% przypadków.

Bardzo interesująco wypadło również zestawienie rodzajów drobnoustrojów biorących udział w zanieczyszczeniu konserw. Stwierdzono, że zarodnikujące drobnoustroje tlenowe stanowią przeciętnie 75—80% mikroflory tlenowej występującej w badanych konserwach. Związane jest to prawdopodobnie z wstępnymi procesami technologicznymi, w których ulegają zniszczeniu formy wegetatywne, a pozostają tylko formy przetrwalnikowe.

Badano właściwości fizyko-chemiczne konserw zupełnie jałowych, w których drobnoustroje stwierdzano jedynie w preparatach bezpośrednich, jak również i tych, w których preparaty bezpośrednie i posiewy wykazywały obecność drobnoustrojów w różnych ilościach. Z cech fizyko-chemicznych określano pH metodą kolorymetryczną przy pomocy papierków uniwersalnych. Ponadto określano klarowność wyciągu, a następnie obecność amoniaku przy pomocy odczynnika Nesslera i obecność siarkowodoru przy pomocy octanu ołowiu. Uzyskane wyniki badań wykazały, że brak współzależności między ilością drobnoustrojów występujących w konserwach a własnościami fizyko-chemicznymi tych konserw.

Usiłowano też ustalić, czy istnieje jakiś stosunek między okresem produkcji konserw (lato lub zima) a stopniem ich zakażenia. Na podstawie przebadanego materiału można stwierdzić, że minimalne wahania, jakie zaobserwowano, nie dają żadnej podstawy do stwierdzenia istnienia współzależności między wymienionymi wyżej czynnikami.

Stoły, na których przygotowywano surowiec, kryte blachą i spawane na złączach, każdorazowo po pracy zmywane były gorącą wodą z sodą. Deski z drzewa topolowego, po uprzednim mechanicznym oczyszczeniu ich, zmywano w podobny sposób. Dwukrotnie przeprowadzano badanie pobierając w sposób jałowy materiał w postaci zeskrobin ze stołów i desek przed oraz po ich umyciu. Analiza otrzymanych wyników pozwala na stwierdzenie, że mycie stołów gorącą wodą z dodatkiem sody (1-2%) nie ma żadnego znaczenia praktycznego, gdyż nie powoduje zmniejszania się ilości drobnoustrojów zarodnikujących.

Ponieważ w trakcie pracy stwierdzono, że konserwy tłuste (wieprzowe) są w silniejszym stopniu zakażone drobnoustrojami niż konserwy chudsze (wołowe), postanowiono więc prześledzić, w jakim stopniu dodatek tłuszczu może mieć wpływ na proces sterylizacji oraz jaki wpływ wywierają wolne kwasy tłuszczowe na zawarte w konserwie drobnoustroje zarodnikujące.

Przebadano zachowanie się zarodnikujących drobnoustrojów tlenowych w konserwach, w których zwiększono ilość tłuszczu, oraz w konserwach, do których dodano tłuszczu o wyższej kwasowości (do 8° K).

Do badań użyto konserwy wołowej. Analiza wyników badań nie upoważnia do wysnucia żadnego wniosku co do wpływu wolnych kwasów tłuszczowych na przebieg sterylizacji. Podkreślić jednak należy, że konserwy kontrolne, uboższe w tłuszcz niż konserwy doświadczalne, wykazywały zupełną jałowość.

Zarodnikujące drobnoustroje tlenowe, wyizolowane z konserw w toku pracy, poddano bliższym badaniom. Na podstawie ich stosunku do węglowodanów można by podzielić badane szczepy na 25 grup fizjologicznych.

Фр. Чаплински

СПОРООБРАЗУЮЩИЕ АЭРОБНЫЕ БАКТЕРИИ В МЯСНЫХ КОНСЕРВАХ

Резюме

Автор исследовал 1305 банек мясных консервов 32 ассортиментов. Чаще всего встречаются спорообразующие аэробные бактерии (75% — 80%). Не замечено корреляции между количеством микроорганизмов и физикохимическими свойствами консервов.

Fr. Czapliński

SPOREFORMING AEROBIC BACTERIA IN CANNED MEAT

Summary

The author examined 1305 samples of canned meat. 75 — 80% of cans contained an aerobic sporeforming bacillus.

No correlation was found between the presence of this bacillus and the physico-chemical properties of product.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

I. Michalska

PRAKTYCZNE ZNACZENIE BADAŃ NAD TERMOODPORNOŚCIĄ SZCZEPÓW BAKTERYJNYCH DLA KONTROLI BAKTERIOLOGICZNEJ W PRZEMYŚLE KONSERWOWYM

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ НАД ТЕРМОСТОЙКОСТЬЮ БАКТЕРИЙНЫХ СПОР ДЛЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ В КОНСЕРВНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

THE INVESTIGATION ON THE RESISTANCE TO TEMPERATURE OF CERTAIN BACTERIA AND ITS SIGNIFICANCE FOR THE EVALUATION OF STERILITY OF CANNED MEAT

Z Instytutu Zootechniki, Oddział w Bydgoszczy

W ramach badań nad przyczynami zepsucia bakteriologicznego konserw mięsnych sterylizowanych przeprowadziliśmy badania nad termoodpornością pewnej ilości szczepów bakterii najczęściej spotykanych. Uzyskane dane pozwoliły dokonać próby oceny procesu sterylizacyjnego, którego działaniu produkt został poddany.

W odniesieniu do praktyki przemysłu konserwowego efektywny proces sterylizacji musi być wyczerpaniem odporności drobnoustrojów bytujących w surowcu przed sterylizacją.

Efekt destrukcyjnego działania czynnika ciepła jest funkcją temperatury i czasu, ale równocześnie zależy od wielu czynników związanych z organizmami.

Od łącznego działania tych czynników zależy nachylenie krzywej, wykreślonej na skali semilogarytmicznej, ilustrującej zależność pomiędzy ilością komórek pozostających przy życiu na jednostkę objętości a czasem ogrzewania. Daje się ono wyrazić wielkością odpowiadającą ilości stopni temperatury, potrzebną na przejście prostej przez jeden cykl logarytmiczny, a odczytaną na skali temperatur. Wielkość tę za S t u m b o (1949) oznaczamy symbolem Z i matematycznie wyrażamy wzorem:

$$Z = \frac{U}{\log a + p},$$

gdzie U jest czasem ogrzewania, a — ilością początkową organizmów w próbie poddawanej ogrzewaniu, p — logarytmem odwrotności liczby organizmów pozostałych przy życiu po czasie ogrzewania U.

Wielkość Z w stałych warunkach jest stała. Oznaczenie jej, przy znanej termoodporności szczepów w danym produkcie i określonym czasie działania termicznego, nie przedstawia trudności. Znając wartość Z, czas sterylizacji i liczbę początkową bakterii na jednostkę objętości produktu, możemy wyliczyć liczbę organizmów pozostałych przy życiu po sterylizacji. Możemy zatem ocenić skuteczność procesu sterylizacyjnego, inaczej stopień trwałości konserw na podstawie obiektywnych mierników, zgodnie z założeniem, że każdy proces ogrzewania w zastosowaniu do przetwórstwa konserwowego ma jakąś wartość absolutną, wymierną.

Próbę oceny procesu sterylizacyjnego zastosowanego w przemyśle wykonaliśmy dwukrotnie: raz dla partii konserw „Gulasz wieprzowy", wykazującej wstępne zakażenie (przed sterylizacją zarodniki pałeczki beztlenowej o cechach zbliżonych do *Cl. lentoputrescens* w ilości 75 na 1 ml) i raz dla partii tego samego typu konserw, ale zakażonych zarodnikami bliżej nie określonego tlenowca zarodnikującego, w ilości 630 na 1 ml.

I. Termoodporność zarodników *Cl. lentoputrescens*, stwierdzona doświadczalnie w naszym laboratorium, wynosi 40′ w 115°. Próba termoodporności została wykonana w 10 ampułkach 1 ml, a więc poddano ogrzewaniu 750 zarodników w objętości 10 ml podłoża, przyjętego za analegiczne do konserw „Gulasz wieprzowy". Po czasie 40′ przy życiu pozostał 1 zarodnik.

$$\text{Stąd: } Z = \frac{40}{\log 750 + \log 1} = 13{,}9.$$

W procesie przemysłowym czas sterylizacji dla gulaszu wieprzowego wynosi 90′. Liczba początkowa bakterii na jednostkę produktu i liczba Z, takie jak w próbie na termoodporność. Ze wzoru: $U = Z\,(\log a + p)$ możemy wyliczyć p i dalej ilość zarodników, które mogą zostać przy życiu po procesie termicznym.

$$90 = 13{,}9\,(\log 750 + p)$$
$$p = 3{,}60$$

Liczbą, której logarytmem jest 3,60 — jest 3990, a odwrotnością jej: $\frac{1}{3990}$.

W wypadku zakażenia konserw zarodnikami danych bakterii, w ilości 750 zarodników na 10 ml, jeden zarodnik może przetrwać w 3990 takich objętości, tzn. w 39,9 litra, a więc w przybliżeniu możliwe jest przeżycie jednego zarodnika na *ca* 40 puszek. Można zatem przewidywać bombaż 2,5% partii konserw.

II. Termoodporność zarodników pałeczki tlenowej stwierdzona laboratoryjnie wynosi 30′ w 95°. Poddano ogrzewaniu 6 300 zarodników w 10 ml podłoża o cechach gulaszu wieprzowego. Po czasie 30′ wzrost wykazały posiewy z 2 ampułek na 10, stąd:

$$Z = \frac{30}{\log 6\,300 + \log \frac{1}{2}}$$

Czas procesu sterylizacyjnego przemysłowego wynosi 90′, ilość zarodników bakterii na jednostkę produktu taka jak przy laboratoryjnym oznaczaniu termoodporności, wartość Z ta sama, stąd obliczyć możemy ilość zarodników, które pozostaną przy życiu po procesie termicznym:

$$90 = 8{,}5\,(\log 6\,300 + p)$$
$$p = 6{,}7$$

6,7 jest logarytmem liczby 5.020.000, a jej odwrotnością jest $\frac{1}{5.020.000}$.

W wypadku gdy w objętości 10 ml produktu przed sterylizacją jest 6 300 zarodników, to jeden zarodnik może przetrwać w 5 020 000 takich objętości, czyli w 50 200 litrach, a więc w przybliżeniu możliwe jest przeżycie 1 zarodnika na *ca* 50 000 puszek konserw. Uwzględniając jeszcze, że w procesie przemysłowym ogrzewa się produkt w 115°, stwierdzamy bezwzględnie, że zastosowany w przemyśle proces daje pełną gwarancję trwałości produktu.

Obie wykonane próby oceny procesu sterylizacyjnego wydają się przeprowadzone prawidłowo i pokrywają się z wynikami kontroli termostatowej, przeprowadzonej w przetwórni dla danych partii konserw.

LITERATURA

1. Stumbo C. R., 1949: Termobacteriology as applied to Food Processing, California.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

J. Jakubowska, J. Mokrzycki, K. Niemyski i *Z. Bednarek*

OTRZYMYWANIE DROŻDŻY PASTEWNYCH NA HYDROLIZATACH Z HYDROLIZY WSTĘPNEJ DREWNA SOSNOWEGO METODĄ SIARCZANOWĄ *

Z Zakładu Fizjologii Roślin i Mikrobiologii Uniwersytetu w Łodzi

Hydrolizaty z hydrolizy wstępnej stanowią produkt uboczny przy przerobie drewna sosnowego na masy wiskozowe, przeznaczone do wyrobu włókien sztucznych.

Hydrolizę wstępną należy traktować jako zabieg uszlachetniający, który poprzedza właściwy proces technologiczny roztwarzania drewna. Przeprowadza się ją, działając na zrębki drewna rozcieńczonym kwasem siarkowym przy wyższej temperaturze i podwyższonym ciśnieniu. Otrzymany hydrolizat zawiera cenne składniki organiczne głównie w postaci cukrów prostych heksoz i pentoz, powstałych z rozkładu hemiceluloz i stanowi produkt odpadkowy, produktem głównym zaś jest wolna od tych węglowodanów, wysokiej jakości masa celulozowa. Cukry zawarte w hydrolizacie można wykorzystać na drodze chemicznej i biologicznej. Jednym ze sposobów przerobu cukrów, zawartych w hydrolizacie, jest biologiczna synteza białka.

Oprócz wymienionych cukrów w hydrolizacie znajdują się w drobnych ilościach inne związki organiczne, jak: dekstryny, substancje żywiczne, furfurol, kwas mrówkowy i octowy. Głównymi składnikami nieorganicznymi są kwas siarkowy oraz sole wyekstrahowane z drewna. Ponieważ hydrolizat jest ubogi w związki azotowe i fosforowe, dodaje się je przy fermentacji jako niezbędne dla budowy ciał białkowych drożdży.

Z nielicznych prac, spotykanych w literaturze fachowej na temat hydrolizy wstępnej, należy wymienić prace Dörra (1940 a, b, c, 1941), który w oparciu o obszerne badania w laboratorium oraz na stacjach doświadczalnych firmy Phrix-Werke (1941 - 44) uzasadniał konieczność uszlachetniania mas celulozowych, uważając metodę siarczanową w połączeniu z hydrolizą wstępną za bardziej właściwą od procesu siarczynowego. Pogląd ten znalazł potwierdzenie w studiach Surewicza (1950), który hydrolizę wstępną zalicza do metod najbardziej skutecznych i opłacalnych. We wnikliwych badaniach, mających na celu ustalenie wskazań technicznych, dotyczących warunków hydrolizy wstępnej, dającej przy możliwie dużej wydajności cukrów maksymalne wydajności mas celulozowych, Surewicz (1951) przeanalizował wpływ 3 czyn-

* Praca została wykonana na zlecenie Centralnego Zarządu Przemysłu Papierniczego w okresie 1.XII. 1949 — 1.X. 1950 r.

ników: temperatury (w granicach 110 — 140°), stężenia H_2SO_4 (0,1 — 1,0%) i czasu hydrolizy (30 — 360 minut). Ocena wyników hydrolizy pod kątem wydajności cukrów i składu hydrolizatów oraz roztwarzalności drewna i własności mas celulozowych doprowadziła tego badacza do ustalenia następujących optymalnych warunków hydrolizy wstępnej: temperatura maksymalna 120 — 130°, przy stężeniu H_2SO_4 0,20 — 0,30%, w czasie 150 — 180 minut; z zachowaniem stosunku masy cieczy do masy bezwzględnie suchego drewna: 4.5 — 5,5 : 1. W powyższych warunkach przeciętnie otrzymuje się hydrolizat o następujących własnościach:

stężenie substancji redukujących	20 — 22	g/litr
kwasowość	2,5 — 4,5	g/litr H_2SO_4
furfurol wolny	około 0,15	g/litr, co stanowi *ca* 0,7% w stosunku do substancji redukujących.

Substancje redukujące stanowią około 87% suchej masy hydrolizatu, z czego 32% przypada na pentozany. Kwasy organiczne w ilości 4% reprezentują około 40% ogółu kwasów. Hydrolizaty powinny mieć możliwie jasną barwę koloru żółtopomarańczowego.

Celem niniejszej pracy były próby wykorzystania hydrolizatów do produkcji drożdży pastewnych. Jako podłoże do hodowli służyły hydrolizaty otrzymane w Centralnym Laboratorium Celulozowo-papierniczym drogą hydrolizy wstępnej zrębków sosny, przeprowadzonej laboratoryjnie przez Surewicza (1951). W tabeli I zestawione są dane dotyczące warunków hydrolizy próbek hydrolizatów dostarczonych do badań, z pominięciem danych o „zlewkach", które były mieszaniną hydrolizatów otrzymanych w różnych warunkach. Warunki hydrolizy były częściowo jednakowe: stosunek ilości cieczy do suchego drewna wynosił wszędzie 5 : 1, a temp. początkowa hydrolizy 60°. Zmienne natomiast były dawki H_2SO_4: od 0,20 do 0,32%, a w pierwszej próbie 0,51%; temperaturę maksymalną hydrolizy utrzymywano w granicach od 120 do 130°, a czas gotowania w tej temperaturze — od 120 do 180 minut. Ponieważ objętość prób jednego pochodzenia była niewielka, 2 — 5 litrów, zarówno prac wstępnych, zmierzających do ustalenia metody przygotowania hydrolizatów jako podłoża do fermentacji, jak i opracowania metody analitycznej, nie można było przeprowadzać w wielu powtórzeniach na hydrolizacie tego samego pochodzenia. (tab. I).

Prace wstępne polegały na ustaleniu: 1) metod analitycznych odpowiednich dla badania składu chemicznego hydrolizatów, 2) wskazań dla techniki oczyszczania hydrolizatów surowych, które bezpośrednio nie nadają się do przerobu na drodze biologicznej.

METODY ANALITYCZNE

Metody analityczne uzgodniono z oddziałem analiz technicznych Centralnego Laboratorium Celulozowo-papierniczego w Łodzi i zastosowano po sprawdzeniu. W hydrolizatach surowych i oczyszczonych oznaczano: pH jonometrycznie, kwasowość ogólną — miareczkowo, substancje redukujące — metodą Schoorla, furfurol całkowity i wolny — metodą Tollensa i Krügera. W próbach fermentacyjnych oznaczano plon drożdży suchej masy w g, zawartość azotu — metodą Dumasa, zmodyfikowaną przez Bobrańskiego i Suchardę, i P_2O_5 metodą Scheffera oraz pozostałość substancji redukujących w brzeczce po fermentacji — metodą Schoorla.

Metoda Schoorla została specjalnie zmodyfikowana dla hydrolizatów przez analityków szwedzkich (Verein der schwed. Pap. u. Zellstoffing. 1942) i w porównaniu z innymi metodami daje znacznie dokładniejsze wyniki. Poniżej przytaczamy dokładny przepis jej stosowania:

Tabela I

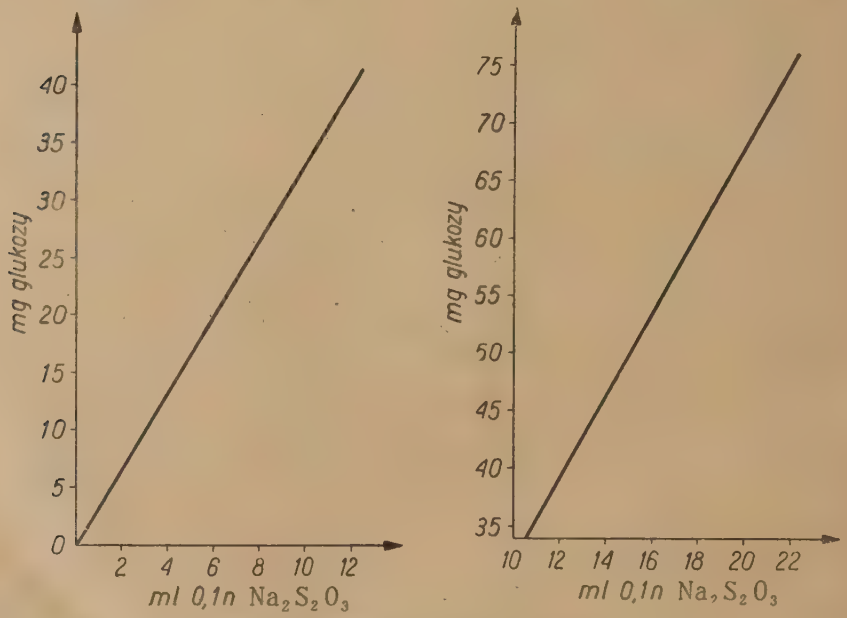
Warunki hydrolizy wstępnej hydrolizatów
(na 100 g suchej masy drewna brano 490 ml kwasu siarkowego)
Условия предварительного гидролиза древесины
Conditions of initial hydrolysis of samples of hydrolyzates

Oznaczenie hydrolizatu	H_2SO_4 % wag.	Stosunek ilości cieczy do suchej masy drewna	Temperatura początkowa hydrolizy	Temperatura maksymalna hydrolizy	Czas gotowania do temp. maksymalnej, minut	Czas gotowania przy temp. maksymalnej, minut	Wygląd zewnętrzny hydrolizatu			Objętość próby w litrach
							Kolor	Klarowność	Zapach	
H_3 H_4	0,495 0,51	5 : 1 5 : 1	60° 60°	120° 120°	120 75	120 120	żółto-brązowy	osad kłaczkowaty	żywiczny	2,5
H_5	0,32	5 : 1	60°	125°	125	125	„	„	„	1,7
H_6	0,25	5 : 1	60°	125°	120	180	„	osad z tend. do opadania	„	5,0
H_7	0,20	5 : 1	60°	130	120	180	słaby żółto-zielony	słaba zawiesina	„	2,5
H_8	0,25	5 : 1	60°	125°	120	150	„	„	„	3,1
H_9	0,20	5 : 1	60°	130°	120	150	„	„	„	2,0
H_{10}	0,25	5 : 1	60°	130°	120	180	„	„	„	2,5
H_{11}	0,25	5 : 1	60°	125°	120	180	„	„	„	2,0
H_{12}	0,15	5 : 1	60°	135°	120	150	„	„	„	3,2

50 ml hydrolizatu z dodatkiem 2 — 3 g strąconej kredy, po wymieszaniu kilkakrotnym i po 30 minutach odstania, przesącza się do kolby miarowej na 500 ml, dopełniając wodą destylowaną po kreskę. Do kolby Erlenmeyera objętości 200 ml odmierza się: 10 ml soli Seignetta (350 g $C_4H_4O_8KNa.\ 4H_2O$ + 100 g NaOH w 1 litrze H_2O) oraz 20 ml H_2O. Ogrzewa się do wrzenia przez 3 — 4 minuty i w chwili wrzenia szybko (w ciągu 30 sekund) wpuszcza pipetą 10 ml przygotowanego na początku, rozcieńczonego (1 : 10) hydrolizatu. Całość gotuje się przez 3 minuty. Następnie szybko studzi w strumieniu wody do 20 — 25°, po czym dodaje 10 ml KJ(300 g KJ w 1 litrze H_2O) i cały czas mieszając wpuszcza się 10 ml H_2SO_4 (ca 250 g H_2SO_4 w 1 litrze H_2O). Po zmieszaniu miareczkuje się 0,1 n tiosiarczanem sodu do zniknięcia zabarwienia jodu, a następnie dodaje roztworu skrobi i miareczkuje do zaniku zabarwienia.

Poprawkę na siarczan miedzi należy wykonać w ślepej próbie, dodając zamiast substancji badanej 10 ml H_2O, a poprawkę na siarczyny — w ślepej próbie, dodając zamiast siarczanu miedzi 10 ml H_2O destylowanej i miareczkując 0,1 n roztworem jodu.

Na podstawie zużytej ilości tiosiarczanu z załączonych krzywych odczytywaliśmy ilość glukozy w mg/l (rys. 1).



Rys. 1. Oznaczanie cukru metodą Schoorla
Рис. 1. Определение количества сахара по методу Шоорля
Fig. 1. Determination of sugar by Schoorle's method

W hydrolizatach drewna sosnowego Sohn i Lenel (1949) wydzielili 4 grupy związków: węglowodany, produkty rozpadu — jak kwas octowy i furfurol, składniki ligniny i składniki żywic.

Smirnow (1948) podkreśla, że zawartość cukrów w hydrolizacie nie jest równa zawartości w nim substancji redukujących, bowiem płyn Fehlinga redukuje wszystkie składniki hydrolizatów posiadające wolne grupy aldehydowe, a więc

również kwasy uronowe, furfurol, substancje huminowe, których drożdże nie mogą wykorzystać.

W rzeczywistości więc zawartość w hydrolizacie substancji redukujących oznaczona metodą Schoorla lub Bertranda w przeliczeniu na glukozę jest wyższa od faktycznej zawartości w nim cukrów prostych.

Oznaczanie furfurolu i pentozanów

Oznaczenie pentozanów przez destylację z kwasem solnym nie jest dokładne. Stosowane mnożniki, otrzymane przy oznaczaniu pentoz, dają wyniki niezgodne, zwłaszcza przy występowaniu kompleksów pentozanów. Stąd pochodzą różnice wyników przy zastosowaniu różnych metod.

Różnorodność metod grawimetrycznych dla oznaczeń furfurolu, podawanych przez poszczególnych analityków, a niekiedy i rozbieżność uzyskiwanych wyników skłoniła nas do poddania sprawdzeniu przyjętej przez nas metody Tollensa i Krügera i do wprowadzenia pewnych modyfikacji. Polegało to na dostosowaniu aparatury do destylacji i uzgodnieniu mnożnika służącego za podstawę do przeliczenia furfurolu na ksylozę. Podany przez Krügera i Tollensa mnożnik 1,52 okazał się za niski. Na podstawie szeregu oznaczeń ksylozy, l-arabinozy i dodatku tych cukrów do hydrolizatu ustalono mnożnik = 1,80 i uzgodniono go z C.L.C.P.

Oznaczenie wolnego furfurolu metodą Tollensa i Krügera zmodyfikowaną i uzgodnioną z C.L.C.P. wykonywaliśmy następująco. Do kolby aparatu służącego do oznaczania pentozanów wprowadzano 75 ml hydrolizatu i około 1 g parafiny. Po oddestylowaniu 30 ml destylatu, dodawano 30 ml wody destylowanej do kolby destylacyjnej i prowadzono okresowo destylację aż do zebrania 260 ml destylatu w kolbie miarowej o pojemności 500 ml. Dodawano do destylatu HCl tak, aby ostateczne jego stężenie wynosiło 13% (co odpowiada c. wł. = 1,065). Odmierzano 100 ml destylatu do kolby stożkowej (do miareczkowania jodu), kolbę zanurzano do zimnej wody i powoli wlewano 200 ml roztworu 1,58 n NaOH. Studzono i powoli dodawano roztworu molibdenianu amonowego (25 g w 1 litrze wody) wstrząsając kolbą. Następnie dodawano roztworu bromianu i bromku potasowego w ilości 25 ml (1,392 g $KBrO_3$ + 10 g KBr w 1 litrze wody) jako środka utleniającego. Kolbę zamkniętą korkiem ustawiono na białej podkładce i obserwowano wystąpienie żółtego zabarwienia. Powstaje ono w ciągu 2 minut, najczęściej już po 15 sekundach. Wtedy pozostawiano roztwór na 4 minuty, po czym dodawano 1 g stałego KJ, silnie mieszano i pozostawiano na 10 minut. Wydzielony jod miareczkowano 0,05 n tiosiarczanem sodu wobec skrobi. Ślepą próbę wykonano tak samo, dając zamiast destylatu 100 ml HCl o c. wł. = 1,065.

Oznaczanie całkowitego furfurolu.

Do kolby aparatu do oznaczania pentozanów wprowadzano 50 ml hydrolizatu i około 1 g parafiny, dodawano 19 ml HCl o c. wł. 1,19 i 31 ml HCl o c. wł. 1,065. Destylowano powoli, zbierano destylat do kolby miarowej na 500 ml. Po zebraniu 30 ml destylatu dodawano do kolby dest. 30 ml HCl o c. wł. 1,065 i destylowano w dalszym ciągu z okresowym dodawaniem HCl do zaniku reakcji z aniliną. Do zebranego destylatu dodawano HCl do kreski tak, aby destylat miał c. wł. 1,065. Dalej postępowano jak przy oznaczaniu wolnego furfurolu.

1 g furfurolu jest chemicznie równoważny 1,56 g ksylozy, ale wobec niezupełnej przemiany stosuje się mnożnik 1,82.

„Związany" furfurol oblicza się jako różnicę ilości całkowitego i wolnego furfurolu; przeliczając go na ksylozę stosuje się mnożnik 1,80.

Wyniki badań składu chemicznego hydrolizatów użytych do pracy zestawiono w tabeli II. Analizy hydrolizatów surowych wykazały kwasowość czynną w granicach pH = 1,26 — 1,62 oraz znaczną zawartość wolnego furfurolu: 0,15 — 1,9 g/litr. Zawartość substancji redukujących jako glukozy wynosiła 16,21 — 25,40 g/litr. Oprócz zbyt wysokiej kwasowości czynnej, którą powinno doprowadzić

Tab

Analiza chemiczna hydrolizatów
Химический анализ гидролиза
Chemical analysis of hydrolyzates

Oznaczanie hydrolizatu	pH	Kwasowość w przeliczeniu na H_2SO_4 w g na 100 ml	Substancje redukujące w g/1000 ml jako glukoza
H_3 surowy	1,35	0,495	6,65
oczyszczony	4,5		5,0
H_4 surowy	1,26	nie oznacz.	16,21
oczyszczony	4,8		15,57
H_5 surowy	1,58	nie oznacz.	16,6
oczyszczony	4,6		15,9
H_6 surowy	1,62	nie oznacz.	20,40
oczyszczony			
$H_6/_{60}$/II/S	4,8		20,10
$H_6/_{50}$/S	4,7		19,20
$H_6/_{40}$/S	4,6		17,10
H_7 surowy oczyszczony	nie oznacz.	nie oznacz.	25,40
$H_7/_{50}$/S gotowany	4,7		25,1
$H_7/_{50}/_5$S nie gotowany	4,6		24,5
$H_7/_{50}$/S nie gotowany oddzielnie sączony	4,8		23,3
H_8 surowy		0,394	19,6
oczyszczony			
$H_8/_1$	4,5		18,7
H_8/2a	4,5		18,7
H_8/2b	4,5		18,7
H_9 surowy	nie oznacz.	0,427	22,8
oczyszczony			
$H_9/_1$	4,5		20,1
$H_9/_2$	4,5		20,3
H_{10} surowy	4,5	0,497	26,9
oczyszczony			26,7
H_{11} surowy		0,372	20,5
oczyszczony	4,5		16,2
Zlewki z 11/VIII.		0,365	17,5
oczyszczony	4,5		17,2
Zlewki z 20/VIII.		0,384	16,8
oczyszczony	4,5		16,4
Zlewki z 4/IX.		0,472	16,6
oczyszczony	4,5		15,9
Zlewki z 9/IX.		0,260	20,5
oczyszczony	4,5		19,6

ela II

surowych i oczyszczonych
тов до и после обработки
before and after purification

Ilość pentoz g/ litr			
Furfurol			
całkowity	związany	w przeliczeniu na ksylozę	wolny
3,05	2,89	4,39	0,16
2,50	2,50	3,80	0,00
5,15	5,00	7,77	0,15
3,8	3,8	5,77	0,00
5,28	5,02	7,63	0,26
4,88	4,88	7,43	0,00
5,48	5,28	8,03	0,20
4,83	4,83	7,43	0,00
4,80	4,80	7,29	0,00
4,88	4,88	7,41	0,00
5,22	4,96	7,54	0,26
4,86	4,86	7,39	0,00
4,90	4,90	7,44	0,00
4,92	4,92	7,47	0,00
5,74	4,28	7,70	1,45
4,00	4,00	7,20	0,00
4,02	4,02	7,23	0,00
4,00	4,00	7,20	0,00
5,94	4,04	7,28	1,9
3,80	3,80	6,82	0,00
3,80	3,80	6,82	0,00
6,14	4,91	8,83	1,26
4,73	4,73	8,49	0,00
5,30	4,06	7,31	1,21
3,85	3,85	6,67	0,00
4,42	3,36	6,05	1,00
3,16	3,16	5,58	0,00
4,20	3,26	5,86	1,00
3,12	3,12	5,61	0,00
4,25	3,44	6,19	0,80
3,35	3,35	6,19	0,00
4,90	4,75	8,55	0,21
4,01	4,01	7,21	0,00

się do optymalnego pH dla rozwoju drożdży, zwraca również uwagę obecny w surowych hydrolizatach furfurol w stanie wolnym, który ma wpływ ujemny, a niekiedy nawet całkowicie hamujący rozwój drożdży. Szarkow (1950) ilustruje hamujący wpływ furfurolu na rozwój drożdży, przytaczając następujące dane:

stężenie furfurolu w %%	czas podwojenia liczby komórek drożdży (w godz.)
0,00	6,38
0,01	6,63
0,10	9,29
0,20	12,68

Z wyżej omówionych względów surowe hydrolizaty musiały być poddane zabiegowi oczyszczania w celu usunięcia składników hamujących rozwój drożdży. Jednocześnie wprowadzano do nich odpowiednie ilości soli odżywczych i normowano pH środowiska, przy możliwie najmniejszych stratach cukrów. Hydrolizaty oczyszczone powinny zachować możliwie jasne zabarwienie i jak najmniej pienić się w czasie fermentacji.

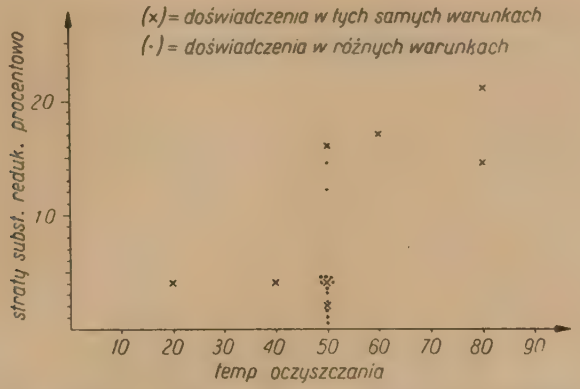
W raportach firmy Phrix-Werke (1941 — 42) spotykamy pewne wskazania dotyczące przygotowania hydrolizatu drożdży. Na podstawie badań fabrycznych w Jeleniej Górze i Wittenberdze, zmierzających do ustalenia procesu technologicznego fabrykacji drożdży pastewnych na hydrolizatach z hydrolizy wstępnej drewna, wyprowadzono następujące wskazówki: bezpośrednio po hydrolizie surowy hydrolizat należy wietrzyć na gorąco dla usunięcia kwasów lotnych, które powodują między innymi szare zabarwienie drożdży. Neutralizację do pH = 7,5 należy przeprowadzić 10% mlekiem wapiennym w 45°, przy silnym mieszaniu z pomocą powietrza (4 m³ powietrza/godz., co obniża zdolność pienienia się podłoża). Tworzący się przy tym osad gipsu oczyszcza hydrolizat. Ilość CaO wynosi około 50 kg na 1 m³ hydrolizatu. Jako środki oczyszczające a równocześnie wzbogacające podłoże zalecany jest dodatek soli azotowych, amoniaku i superfosfatu, zamiast kosztownego dwuzasadowego fosforanu amonu. Po neutralizacji środowisko należy znowu zakwasić H_2SO_4. Po starannym wymieszaniu i odstaniu hydrolizat należy przesączyć i użyć do fermentacji.

OCZYSZCZANIE HYDROLIZATÓW SUROWYCH

Wykonane przez nas próby oczyszczania hydrolizatów miały ustalić wpływ czynników fizyko-chemicznych na przebieg oczyszczania oraz na przebieg fermentacji na hydrolizacie oczyszczonym. Jako środki chemiczne stosowano 10% mleko wapienne, amoniak i superfosfat w odpowiednich dawkach.

Na podstawie licznych doświadczeń nad oczyszczaniem hydrolizatu w temperaturach 20, 40, 45, 50, 60 i 80° stwierdzono największe straty substancji redukujących w temperaturach wyższych. Wyższe temperatury wpływały również ujemnie na zabarwienie hydrolizatu powodując ściemnienie drożdży. Wprawdzie przez oczyszczanie w temperaturach niższych zmniejsza się straty cukrów, jednak skłonność do pienienia się hydrolizatów podczas fermentacji jest znacznie większa niż po oczyszczaniu w temperaturach wyższych.

Załączony rys. 2. przedstawia wpływ temperatury na ubytek substancji redukujących. Biorąc pod uwagę wymienione 3 parametry: straty substancji redukujących, zmianę barwy i pienistość, ustalono jako optymalną temperaturę oczyszczania 50°.


(x)= doświadczenia w tych samych warunkach
(·)= doświadczenia w różnych warunkach
straty subst. reduk. procentowo
20
10
10 20 30 40 50 60 70 80 90
temp oczyszczania

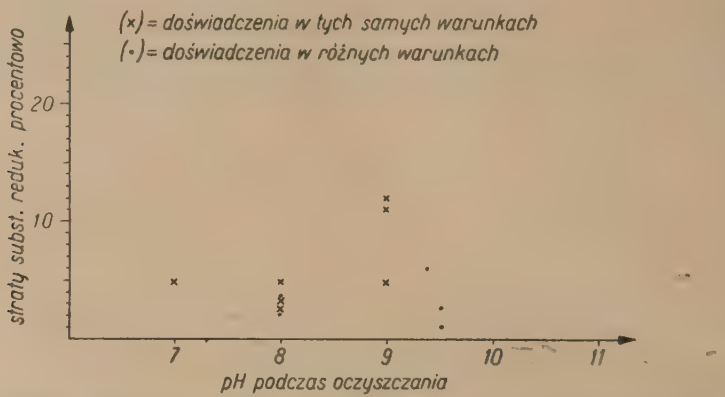
Rys. 2. Wpływ temperatury na ubytek substancji redukujących
Рис. 2. Влияние температуры на уменьшение количества восстанавливающих субстанций
Fig. 2. The amount of reducing sugars as a function of the temperature of hydrolysis

Przy dawkowaniu środków chemicznych potrzebnych do oczyszczania hydrolizatu wykonano próby mieszania mechanicznego za pomocą powietrza.

Mieszanie za pomocą powietrza przewyższa zabieg czysto mechaniczny nie tylko ze względu na dokładniejsze wymieszanie płynu, ale również dzięki temu, że usuwa ze środowiska kwasy lotne oraz związki aromatyczne, ujemnie wpływające na przebieg fermentacji. Stwierdzono, że silniejsze rozproszenie powietrza przy użyciu świecy Chamberlanda dawało wyniki znacznie lepsze. Intensywność wietrzenia należy uzależnić od przekroju stosowanych naczyń, tak aby ilość powietrza wynosiła 5 m^3 na godzinę na 1 m^3 hydrolizatu. Stosowany czas wietrzenia w naszych doświadczeniach wynosił 3 godziny. W pierwszych doświadczeniach użyto 10% mleko wapienne jako środek wiążący kwasy, wytrącający związki niecukrowe oraz barwiące. Powstawanie znaczniejszych ilości trudno odsączalnego osadu skłoniło nas do wiązania kwasu amoniakiem, którego sole, głównie $(NH_4)_2SO_4$, jako rozpuszczalne pozostają w hydrolizacie i stanowią pożywkę dla drożdży. Użycie samego amoniaku do oczyszczania daje wprawdzie najlepsze wyniki, ale równocześnie nie jest racjonalne ze względu na straty azotu, którego drożdże nie mogą całkowicie wyzyskać. Zapotrzebowanie na pożywkę azotową i fosforową w czasie fermentacji musi się stopniowo regulować w miarę rozwoju fermentacji. Z tego względu użycie w pierwszej fazie fermentacji wyłącznie amoniaku do oczyszczania jest niekorzystne, gdyż ilość siarczanu amonu przewyższa potrzebną ilość azotu o 40%.

Próby nad ustaleniem optymalnego pH podczas oczyszczania wykazały, że leży ono w granicach od 7 do 8. Silniejsza alkalizacja środowiska okazała się niewskazana ze względu na znaczne straty substancji redukujących, które przy pH = 11 wynosiły 19,3%. Furfurol zostaje całkowicie usunięty już przy pH = 7, a straty substancji redukujących wtedy wynoszą nie więcej niż 4,6%. Wyniki doświadczeń nad wpływem pH przy alkalizacji na straty substancji redukujących ilustruje rys. 3.

Poza amoniakiem i 10%-wym mlekiem wapiennym użyto również jako środka oczyszczającego superfosfatu w ilości 12,5% na 100 g substancji redukujących.



Rys. 3. Wpływ stopnia alkalizacji (pH) na ubytek ilości substancji redukujących
Рис. 3. Влияние изменений значения pH на уменьшение количества восстанавливающих субстанций
Fig. 3. The amount of reducing sugars as a function of changes in pH of hydrolyzates

Wprowadzenie superfosfatu powodowało zwiększenie ilości soli wapniowych, wiążących związki niecukrowe, a równocześnie wzbogacało hydrolizat w pożywkę fosforową, niezbędną w pierwszej fazie fermentacji. Superfosfat wpływa również korzystnie na zabarwienie hydrolizatu.

Wpływ oczyszczania hydrolizatów na zawartość substancji żywicowych

W kolejnych próbkach hydrolizatu oznaczonych jako H_5, H_6 itd. (tabl. I) określano zawartość substancji rozpuszczalnych w eterze. Próby polegały na wytrząsaniu 10 ml hydrolizatu z 10 ml eteru przez 10 minut. Po oddzieleniu płynów pobierano 5 ml frakcji eterowej, odparowywano w 65°, otrzymując pozostałość żywiczo-aromatyczną. Wyniki oznaczeń w hydrolizatach surowych i po oczyszczeniu były następujące:

Hydrolizat	Zawartość substancji rozpuszczalnych w eterze	
	g/litr	ubytek w %
H_5 surowy	0,60	
oczyszczony mlekiem wapiennym w 20°	0,58	3,3
„ 50°	0,56	6,7
„ 80°	0,52	13,3
H_6 surowy	0,43	
oczyszczony mlekiem wapiennym	0,20	53,5
mlekiem wap. i amoniakiem	0,18	58,1
H_7 surowy	0,43	
oczyszczony mlekiem wapiennym	0,19	48,8
mlekiem wap. i amoniakiem	0,20	53,5

Próby powyższe wykazały zmniejszanie się zawartości substancji rozpuszczalnych w eterze prawie o 50%, szczególnie przy zastosowaniu oczyszczania mlekiem wapiennym i amoniakiem. Zwiększało to przydatność hydrolizatu jako podłoża do fermentacji.

Tabela III przedstawia wpływ alkalizacji mlekiem wapiennym, amoniakiem i superfosfatem na wynik oczyszczania. Pozwala to na całkowite usunięcie furfurolu. Poza tym, jak stwierdziliśmy, oczyszczanie powodowało również nieznaczne obniżenie zawartości substancji redukujących, które w poszczególnych próbach hydrolizatów wynosiło 0,8 — 5,8%, natomiast pentoz 2,1 — 9,2% w stosunku do ogólnej ich zawartości.

W wyniku przeprowadzonych prób ustalono następującą metodę oczyszczania hydrolizatu:

1. Hydrolizat surowy należy ogrzać do 45 — 50° przy energicznym mieszaniu powietrzem (w ilości 5 m³ powietrza na 1 m³ hydrolizatu i na 1 godz.).
2. Alkalizować początkowo amoniakiem w ilości odpowiadającej 5,23% N na 100 g substancji redukujących dla uzyskania pH 5,5 — 6, a następnie 10% mlekiem wapiennym do pH 7 — 8. (Po dodaniu amoniaku wzrasta pienistość hydrolizatu podczas wietrzenia, a równocześnie wydziela się osad kłaczkowaty o zabarwieniu żółtozielonkawym).
3. Po 30 minutach dodać superfosfat w formie szlamu w ilości 12,5 g P_2O_5 na 100 g substancji redukujących. Na końcu wprowadzić 2,85% K_2SO_4 i 1,25% $MgSO_4 . 7 H_2O$ w formie stałej, w przeliczeniu na 100 g substancji redukujących.

Dodatek superfosfatu powodował obniżenie pH do 6,5 — 7,0. Początkowe pH przeznaczonego do fermentacji substratu = 4,5 ustalano zakwaszając go kwasem siarkowym. W ciągu całego procesu oczyszczania hydrolizat był wietrzony powietrzem dokładnie rozproszonym przez świecę Chamberlanda w ciągu około 3 godzin. Po 3 godzinach klarowania oczyszczony hydrolizat dekantowano i sączono na lejkach Büchnera przez bibułę.

Hydrolizaty oczyszczone wyżej opisaną metodą były całkowicie wolne od furfurolu, klarowne, o zabarwieniu jasnosłomkowym, znacznie mniej pieniące się w czasie fermentacji niż bez oczyszczania.

PRÓBY BIOLOGICZNEGO ZUŻYTKOWANIA HYDROLIZATÓW

Produkcja drożdży pastewnych na innych podłożach pochodzenia niespożywczego została dokładnie przebadana i wprowadzona do przemysłu w wielu krajach. Natomiast na temat wyzyskania na drodze biologicznej hydrolizatów z hydrolizy wstępnej spotkaliśmy tylko nieliczne dane.

Illig (1950) podkreśla wartość tego podłoża, które można przetwarzać na białko za pomocą drożdży rodz. *Torulopsis*, grzybków *Monilia* i *Oospora*, przy wydajności (na hydrolizacie sosny) 49 — 50 kg drożdży suchych ze 100 kg substancji redukujących. Otrzymany produkt jest bogaty w glutation, lecytynę, witaminy B_1 i B_2, stanowiąc białko łatwo przyswajalne, o wyższej wartości pokarmowej niż roślinne, a prawie dorównujące zwierzęcemu.

Wg raportów stacji f. Phrix-Werke (1941) stosując kultury *Torula utilis* otrzymywano przy zużyciu cukru 82,5 — 94,3% wydajność drożdży w stosunku do cukru od 32,1 do 46,8%, o zawartości białka 46,5 — 53,5%, popiołu 6,5 — 7,95%. Fermentację prowadzono 10 — 12 godzin. Ze względu na łatwość zakażeń drożdżami kożuchowymi, „pasożytującymi na komórkach" *Torula*, należy stosować wietrzenie powietrzem odkażonym przez filtr z waty i warstwę olejową. Fermentacji ciągłej nie udało się wprowadzić wobec skłonności drożdży do osiadania na ścianach aparatury w postaci warstwy podatnej na gnicie.

Tabela 3

Wpływ amoniaku i mleka wapiennego stosowanych jako środki alkalizujące dla hydrolizatów

Нейтрализация гидролизатов аммиаком и известковой водой

Influence of neutralizing agents: ammonia and cream of lime

Oznaczenie hydrolizatu	Substancje redukujące		Pentozy		Furfurol		Temperatura oczyszczania °C	pH maksymalne alkalizacji	Środek stosowany do alkalizacji	Środek stosowany do zakwaszania
	w hydrolizacie surowym glukozy g/litr	straty przy oczyszczaniu %	w hydrolizacie surowym g/litr	straty przy oczyszczaniu %	w hydrolizacie surowym g/litr	po oczyszczeniu g/litr				
H_7	25,4	0,8	7,54	2,1	0,26	0,0	50	9,5	amoniak	superfosfat
H_7	25,4	3,5	7,54	2,1	0,26	0,0	50	9,5	amoniak	superfosfat
H_{11}	16,8	2,4	5,86	4,3	1,23	0,0	50	9,2	amoniak	superfosfat + H_2SO_4
H_8	19,6	4,6	7,70	6,1	1,46	0,0	50	9,5	mleko wapienne	superfosfat + H_2SO_4
H_5	16,6	2,4	7,43	6,5	0,26	0,0	50	9,5	mleko wapienne	H_2SO_4
H_6	20,4	5,8	8,03	9,2	0,20	0,0	50	9,5	amoniak+mleko wapienne	superfosfat + H_2SO_4
H_8	19,6	4,6	7,70	6,5	1,46	0,0	50	7,0	amoniak+mleko wapienne	superfosfat + H_2SO_4
H_9	22,8	2,7	7,28	6,3	1,90	0,0	50	9,0	amoniak+mleko wapienne	superfosfat + H_2SO_4

Zużycie pożywek przez drożdże pastewne wynosiło — licząc na 100 kg plonu suchych drożdży:

11,0 kg	K_2SO_4
5,7 kg	$MgSO_4$
23,4 kg	NH_4OH
9,4 kg	$(NH_4)_2SO_4$

Po zdrożdżowaniu pozostawało w brzeczce około 0,5% substancji redukujących. Dla wyrównania pH okazało się konieczne równomierne mieszanie a także odpowiednie wietrzenie, co ściśle liczbowo nie zostało oznaczone. Jako środka przeciw tworzeniu się piany używano oleju (Gärfett) stosowanego przy pienistej fermentacji alkoholowej.

Śledząc literaturę dotyczącą biosyntezy, cenne dane spotkaliśmy w literaturze radzieckiej. Plewako i Czeban (1935) opisali wyodrębnione z wodorostów wybrzeża murmańskiego grzyby *Monilia murmanica* i *Oidium laminarium*, dające maksymalny plon grzyba z wyzyskaniem 100% ksylozy przy stężeniu 1 — 2% jedynie przy zastosowaniu właściwej aeracji regulującej optymalny potencjał oksydoredukcyjny środowiska.

Metabolizm tych grzybów przebiegał odmiennie w warunkach beztlenowych, przy czym z cukrów powstawały kwasy: mrówkowy, moczowy, octowy, etanol i gliceryna, które ulegały następnie dalszemu utlenianiu do CO_2. Autorowie radzieccy kładą nacisk na intensywne przewietrzanie, które można osłabić w razie użycia podłoża o obniżonym stężeniu substancji redukujących. Wg Giwartowskiego i Plewako (1952) w podłożu rozpuszcza się maksymalnie około 7 mg O_2 na 1 litr przy 28 — 30°. W końcu rozmnażania w 1 litrze brzeczki nagromadza się 35 — 40 g drożdży, które zużywają na 1 godz. i 1 litr pożywki 3,5 — 4,0 g O_2. W okresie maksymalnego wzrostu ilość rozpuszczonego tlenu spada do 1,4 mg/1 litr, poniżej zaś 1 mg rozmnażanie drożdży jest niemożliwe. Do gaszenia piany Szarkow (1950) poleca użycie oleju sulfonowanego. Ten sam autor przytacza badania Kriuczkowej nad drożdżami pentozowymi o temperaturze optymalnej rozwoju 38—39°, które korzystały z różnych źródeł węgla, jak kwas octowy, a częściowo lewulinowy. Kriuczkowa podkreśla konieczność doboru właściwej kultury drożdży dla danego środowiska zamiast operowania uniwersalną, jedną kulturą. Przy hodowli na hydrolizatach drzewnych Szarkow zaleca określanie doświadczalne optymalnej dawki drożdży zarodowych dla każdej kultury i podłoża. Wg wskazań niemieckich (Anonim, 1947) ładunek drożdży zarodowych powinien przy procesie Schollera wynosić 800—1000 kg suchych drożdży na 160 m^3 hydrolizatu, czyli około 10 g suchych drożdży na 1,6 litra płynu przeznaczonego do fermentacji. Zdolność wykorzystywania przez drożdże innych źródeł węgla w podłożu poza cukrami jest wg badaczy niemieckich następująca:

ze 100 kg kwasu mlekowego	36,5 kg	suchej masy drożdży,
„ „ „ „ octowego	36,9 „	„ „ „
„ „ „ „ pyrogronowego	28,6 „	„ „ „
„ „ „ etanolu	69,0 „	„ „ „

Dane te wskazują na konieczność obliczania plonu drożdży na podłożach hydrolizatowych w stosunku do zużycia całego przyswajalnego węgla, a nie wyłącznie węgla z cukrów.

Optimum stężenia scukrzonego podłoża przygotowanego do fermentacji należy ustalić na drodze empirycznej. Krach (1951) stwierdziła przy hodowli *Torula utilis* na hydrolizacie z trocin sosnowych, że wydajność drożdży maleje wraz ze wzrostem stężenia środowiska fermentowanego, wyrażonego jako %% stężenia cukrów.

W czasie 24 godz. fermentacji autorka ta otrzymała wydajność drożdży suchych w stosunku do całkowitej zawartości cukrów w podłożu:

	przy stężeniu cukrów	1,5%	— 37,03% wydajności
	„ „ „	1,0%	— 53,07% „
	„ „ „	0,5%	— 57,60% „
a w czasie 8 godz. fermentacji	„ „ „	1,5%	— 34,5% „

Optymalne pH podłoża dla fermentacji zależy od jego buforowości. Wydajność drożdży zależy od właściwości danej kultury, jej zdolności syntezy i wykorzystania substancji odżywczych[1]. Rzecz jasna, że im więcej w podłożu znajduje się przyswajalnych substancji azotowych, tym więcej białka nagromadza się w suchej masie drożdży. Np. w obecności 3% azotu ogólnego otrzymano 60,1% białka w stosunku do zużytego cukru. Jak wiadomo, sole fosforowe i azotowe nie tylko ulegają bezpośredniej asymilacji wchodząc w skład ciał syntetyzowanych, ale grają również rolę pośrednią w przemianach zachodzących w procesie syntezy. Wg Claassena 7% azotu i około 30% fosforu w stosunku do ogólnej ich zawartości w drożdżach zużywa się na reakcje wymienne (Giwartowski 1952).

Nie posiadając szczepów oryginalnych, wypróbowanych jako przydatne do hodowli na stosowanym przez nas podłożu, stanęliśmy wobec zadania:

1° wybrania spośród szczepów posiadanych w kolekcji zakładu takiego, który można by przystosować do omawianego podłoża,

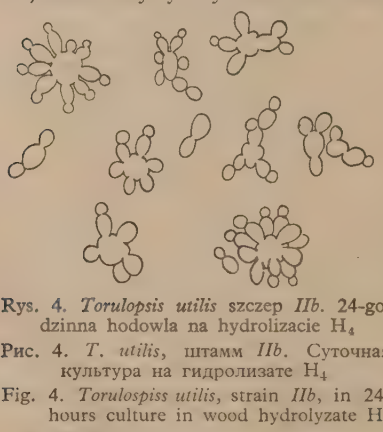
2° lub też wyodrębnienia nowego, odpowiedniego szczepu.

Próby przystosowania szczepów przeprowadzono używając szczepu *Sacch. cerevisiae* Hansen, rasa „Gdańsk" oraz szczepów z rodz. *Torula*, przysłanych nam z laboratorium Centr. Zjedn. Przem. Drożdżowego.

Hodowlę prowadzono na brzeczce z dodatkiem wzrastających stężeń hydrolizatu, nie otrzymując jednak wyników zachęcających do kontynuowania prób nad aklimatyzacją tych szczepów.

Do dalszych badań użyto szczepu wyodrębnionego przez nas z cegiełki piekarskich drożdży handlowych, który zidentyfikowano na podstawie badań diagnostycznych, morfologicznych i fizjologicznych jako *Torula utilis* (Lodder, 1934), oznaczoną jako II-b w kolekcji Zakładu.

Hodowla na hydrolizacie (H_3) — 90% z dodatkiem 5,5% $(NH_4)_2HPO_4$, 4,7% $(NH_4)_2SO_4$, 13,1% 25%-ego $(NH_4)OH$ wykazała po 24 godz. w temperaturze 30° silny wzrost i silne zmętnienie, obfity osad, niklą błonkę opalizującą na powierzchni pożywki. Drożdże pączkowały nie biegunowo, tworząc dokoła komórki macierzystej charakterystyczny układ komórek wtórnych, typowy wg Gillermonda (Lütz 1942) dla rodzaju *Torulopsis*. Ilustruje to rys. 4.



Rys. 4. *Torulopsis utilis* szczep *IIb*. 24-godzinna hodowla na hydrolizacie H_4

Рис. 4. *T. utilis*, штамм *IIb*. Суточная культура на гидролизате H_4

Fig. 4. *Torulospiss utilis*, strain *IIb*, in 24-hours culture in wood hydrolyzate H_4

W 48 godzinnej kulturze przeważały komórki kształtu owalnego lub okrągławego, o wymiarach 5 — 8μ × 3,3 — 5,5μ, tworzące często zespoły łańcuszkowe z licznymi odkładami glikogenu. Reakcję glikogenową uwidocznia fot. a[2]. Po 3—5 dniach w powierzchniowej błonce na płynie stwierdzono liczne formy silnie wydłużone, przypominające kształtem pseudomycelium (fot. *b*), co również znajduje potwierdzenie w obserwacjach innych autorów nad zmiennością morfologiczną u *Torulopsis utilis*.

Rozmnażanie kultury do prób fermentacyjnych prowadzono metodą nagroma-

[1] W tej samej brzeczce hydrolizatowej otrzymywano w postaci masy prasowanej o 75% wody w stosunku do substancji redukujących: 245% wydajności dla *Candida tropicalis*, 252% dla *Monilia murmanica*, do 425% dla kultury *3 B.* (Szarkow 1950).

[2] Fotografie *a* i *b* zamieszczono na Tablicy II.

dzania: kulturę wyjściową wysiewano do 10 kolbek Erlenmeyera a 100 ml, zawierających po 10 ml hydrolizatu rozcieńczonego wodą w stosunku 1 : 1 z dodatkiem pożywek azotowych i fosforowych: $(NH_4)_2HPO_4$ — 0,04%, $(NH_4)_2SO_4$ — 0,02%, $MgSO_4$ — 0,02%, K_2SO_4 — 0,03%; pH = 4,5 — 5,0.

Pożywkę wyjaławiano przez 15 minut przy 100°. Po 3 dniach hodowli w 30—31° przenoszono kulturę do 10 kolb Erlenmeyera a 500 ml, zawierających po 50 ml podłoża o składzie wyżej podanym. Po 3 dniach hodowli drożdże zbierano jałowo na filtrze Seitza i przemywano jałową wodą zakwaszoną kwasem siarkowym. W powyższy sposób otrzymano około 0,5 g świeżej masy drożdży na kolbę. Pierwszą próbę orientacyjną dla sprawdzenia zdolności fermentacyjnych i rozwoju kultury II-b przeprowadzono na hydrolizacie H_6/40 o pH 4,5 i z zawartością substancji redukujących = 0,844%. Drożdże macierzyste rozmnożono metodą wyżej opisaną. Fermentację prowadzono bez wietrzenia w 20° przez 48 godzin. Otrzymano 1,69 g drożdży suchych przy zużyciu cukru 2,95 g, a więc wydajność 57,3%.

Dalsze próby prowadzono w kolbie Bommera w 30 — 31° stosując przewietrzanie rozproszonym powietrzem przy użyciu świecy Soxhleta. Powietrze wyjaławiano przy pomocy płuczki.

W tabeli IV zestawione zostały wyniki tych doświadczeń, w których zmierzano do osiągnięcia najlepszej wydajności drożdży w zależności od następujących czynników:

1. ilości drożdży zarodowych, 2. czasu fermentacji, 3. intensywności nawietrzania hodowli, 4. dawek związków fosforowych i azotowych, 5. stężenia podłoża fermentowanego.

Wydajność drożdży wyraża przyrost suchej masy drożdży ze 100 g sfermentowanych cukrów.

Jak widzimy, w serii prób (1 — 14) prowadzonych w kolbach Bommera stwierdzono, że pierwsze 3 parametry są ściśle współzależne. Słabe nawietrzanie (dośw. 1 — 4 i tabl. II, IV) wpływało wybitnie ujemnie na przyrost masy drożdżowej mimo stosunkowo dużego wysiewu drożdży zarodowych. Skrócenie okresu fermentacji z 30 do 12 godzin (dośw. 6a) wymaga zwiększonej ilości drożdży zarodowych. Dopiero wysiew w ilości 1,67 — 3,34% suchej masy drożdży w stosunku do substancji redukujących przy 12 godz. fermentacji i intensywnym przepływie powietrza dawał wyniki zadowalające (dośw. 9 — 14). Wydajność wynosiła tu 33,4 — 53,8% w stosunku do zużytych substancji redukujących.

Stopień zużycia cukrów w czasie fermentacji wskazuje, że proces odfermentowania jest uzależniony od dawki drożdży, jak i od energii nawietrzania. Jednakże małe zużycie cukrów przy dobrej wydajności (dośw. 10 — 13) zdaje się wskazywać, że drożdże mogą wykorzystywać jako źródło węgla oprócz cukrów również inne składniki podłoża. Wprowadzenie nadmiaru pożywki azotowej i fosforowej (dośw. 1, 5, 7, 8, 10, 11, 13) związane było z próbami nad oczyszczaniem hydrolizatów, zmierzającymi do całkowitego usunięcia substancji żywicznych.

Dalsze doświadczenia (nr 15 — 17) przeprowadzono dążąc do skrócenia okresu fermentacji do 12 godzin, ustalenia sposobów normowanego wietrzenia w zależności od fazy wzrostu drożdży, wreszcie podwyższenia dawki drożdży zarodowych. Do gaszenia piany używano oleju przeciwpianowego produkcji krajowej (wkreplanego). Doświadczenia przeprowadzono w aparacie własnej konstrukcji (rys. 5), utrzymując stałą temperaturę przy pomocy wężownicy połączonej z ultratermostatem Hopplera i mierząc przypływ powietrza za pomocą zegara. We wszystkich doświadczeniach zachowano jednakowe ilości pożywek, odpowiadające zawartości

Tab

Produkcja drożdży

Результаты ферментации, выражаю

Propagation of yeast

L. p.	Oznaczenie hydrolizatu	Stężenie subst. red. w hydrolizacie %	Warunki fermentacji					
			rozcieńczenie hydrolizatu	Ilość substancji redukujących				
				początkowa g	końcowa g	%	zużycie w czasie fermentacji	
							g	%
1	$H_6/S/_{40}$	2,01	1 : 2	4,02	1,10	0,32	2,92	72,6
2	Zlewki $_{19}/_7$	2,01	1 : 1,4	7,03	3,73	0,44	3,30	46,9
3	$H_9/_1$	1,93	1 : 1	11,58	8,52	0,71	3,06	26,5
4	H_{11} $H_{10}/_1$	1,82 1,08	nierozc.	9,56	5,81	0,88	3,75	39,3
5	$H_7/_{50}$/got.	2,16	1 : 2	6,48	1,04	0,12	5,44	83,8
6	$H_9/_2$ a. b.	1,94	1 : 1	11,64 15,02	10,89 6,50	0,93 0,54	0,75 8,59	6,5 57,2
7	$H_7/_{50}$/n. got.	1,84	1 : 2	5,52	3,42	0,04	2,10	38,5
8	$H_6/_{50}$/S	1,92	1 : 2	5,76	2,70	0,30	3,06	53,2
9	$H_9/_1$	1,93	1 : 1	11,58	10,80	0,90	0,78	6,8
10	$H_7/_{50}$/n. got. $H_7/_{50}$/got.	2,28	1 : 1	12,54	3,63	0,33	8,91	71,0
11	$H_6/S/_{60}$	2,02	1 : 2	4,04	2,28	0,38	1,76	43,5
12	$H_8/_1$	1,68	1 : 1	8,15	5,32	0,54	2,83	34,8
13	$H_7/_{50/n}$. got.	2,06	1 : 2	6,18	1,89	0,21	4,29	69,3
14	$H_8/_2$b	1,93	1 : 1	11,58	9,60	0,80	1,98	17,1
15	Zlewki $_4/_9$	1,4	nierozc.	28,00	16,00	0,80	12,00	43,0
16	Zlewki $_4/_9$	1,4	nierozc.	28,0	13,0	0,65	15,0	53,6
17	$H_{z\ 9}/_9$	1,96	2 : 1	27,4	7,94	0,35	19,5	71,3

ela 4

na hydrolizatach

щиеся в получении дрожжевой массы

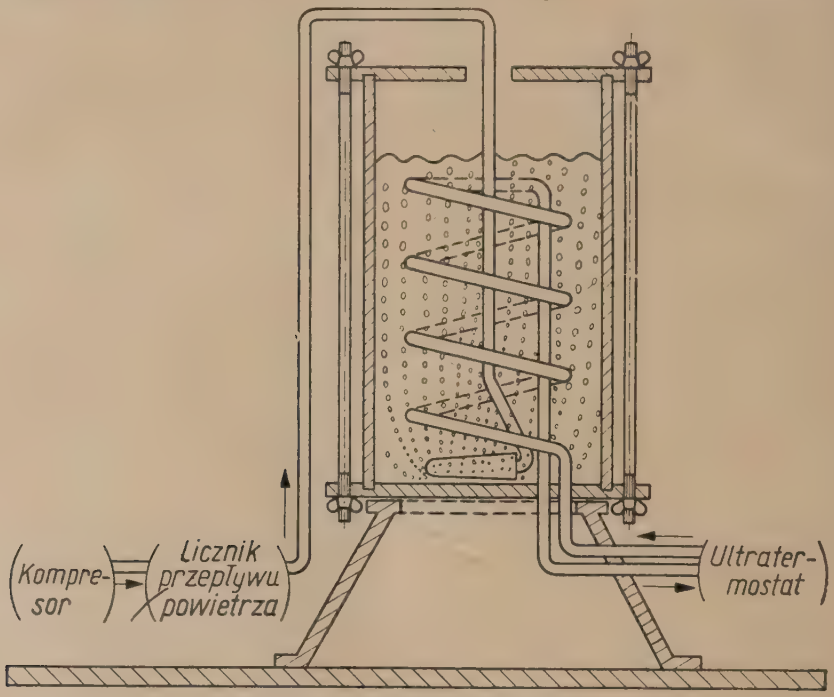
in hydrolyzates

Dawki pożywek w stos. do subst. red.		Czas ferm. godz.	t°	Wietrzenie l/godz.	Drożdże				
					Ilość wysiewu s. masy		Plon		Wydajność %
% N_2	% P_2O_5				g	w stos. do subs. red. %	ogółem g	suchej masy g	
9,9	82,25	30	29,2	słabe	0,085	2,13	1,43	0,38	10,2
6,7	12,5	18	30,0	8	0,63	8,90	4,03	1,09	13,9
5,35	7,8	24	31,0	b. słabe	0,09	0,78	2,26	0,55	15,0
9,3	12,5	23	29,6	8	0,90	9,42	5,93	1,48	15,5
9,5	96,0	30	31,0	84	0,112	1,73	5,00	1,10	18,2
2,67	27,6	12	30,7	50	0,12	1,03	1,32	0,28	21,4
5,35	27,6	36	31,6	49	0,08	0,50	6,24	1,39	15,2
11,1	112,5	30	31,0	84	0,983	15,9	8,555	2,7	33,8
10,4	86,5	30	32,1	słabe	0,025	0,43	3,75	1,01	32,1
5,35	7,8	12	31,9	105	0,38	3,34	2,50	0,64	33,4
10,2	103,9	30	31,0	418	0,21	1,67	14,0	3,64	38,4
9,9	82,2	30	30,9	energicz.	0,068	1,68	2,70	0,75	38,7
5,3	27,3	30	31,0	315	0,16	2,00	7,75	1,56	49,5
9,9	101,3	30	30—32	energicz.	0,16	2,59	8,06	2,32	49,8
2,6	8,4	12	31	90	0,34	3,19	6,06	1,26	53,8
5,4	12,5	12	31	1— 3 15—20 3— 9 40—50 9—12 75	3,14	11,2	31,61	8,36	43,4
5,4	12,5	12	31	1— 3 15 3— 9 50—55 9— 12 30	3,03	11,8	51,10	12,92	65,9
5,4	12,5	12	31,8	1— 3 13 3—11 61 11—12 18	4,71	17,2	53,9	15,81	56,8

w podłożu 5,4% N_2 i 12,5% P_2O_5. Fermentację rozpoczynano w 1/4 objętości hydrolizatu przeznaczonego do próby, resztę dawkowano począwszy od 3 godziny fermentacji przy równoczesnym zwiększaniu dopływu powietrza w sposób następujący:

Godziny fermentacji:	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dawki hydrolizatu w %%:	5	5	10	10	15	15	10	5	0	0

Stężenie cukrów w tych próbach było stałe, wynosząc 1,4%; pH utrzymywano na stałym poziomie za pomocą 10% roztworu sody.



Rys. 5. Aparatura do fermentacji hydrolizatów (schemat)
Рис. 5. Аппаратура для ферментации гидролизата. Схема
Fig. 5. The apparatus for the propagation of yeast on the hydrolyzates

Do pierwszej próby (dośw. 15) użyto drożdży otrzymanych z doświadczenia 14. Część każdego plonu przeznaczano na wysiew do doświadczenia następnego. W próbach tych uzyskano wydajność od 43,4 — 65,9% w stosunku do zużytych substancji redukujących. Wyniki te wskazują, że przy zwiększonym wysiewie (11,2 — 17,2% drożdży), unormowanym dopływie pożywki i procesie wietrzenia — uzyskiwaliśmy lepsze odfermentowanie, co również pokrywało się z lepszą wydajnością masy drożdżowej. Zawartość azotu w otrzymanych drożdżach wynosiła od 7,0 do 7,45% w suchej masie drożdży, co odpowiada około 50% białka.

Kontrola mikroskopowa wykazała w próbie o najwyższej wydajności (dośw. 16) jako maksymalną liczbę komórek drożdżowych — 408×10^6 w 1 ml (w komorze Thoma); wygląd kultury był normalny; komórki luźno rozrzucone, owalne, wiele

w stadium pączkowania, podczas gdy w próbach poprzednich, słabo wietrzonych, występowały liczne konglomeraty komórek, a formy pseudogrzybne stanowiły od kilku (dośw. nr 8) do kilkunastu procent plonu (dośw. nr 2).

Przeprowadzone próby wskazują, że hydrolizaty z hydrolizy wstępnej mogą być wykorzystane do produkcji drożdży pastewnych. Otrzymane wyniki należy traktować jako orientacyjne. Potrzebne jest ścisłe opracowanie procesu produkcji w skali półtechnicznej oraz zbadanie szybkości asymilacji pentoz w stosunku do szybkości przyswajania heksoz, ustalenie bilansu stosowanych pożywek azotowych i fosforowych w stosunku do otrzymanego białka.

WNIOSKI

1. Hydrolizaty z hydrolizy wstępnej (tabl. I), przeprowadzonej w ustalonych warunkach przy procesie uszlachetniania mas celulozowych, można wykorzystać na drodze biologicznej do produkcji białka drożdżowego.
2. Opracowana metoda oczyszczania hydrolizatów surowych pozwala uwalniać je całkowicie od wolnego furfurolu, a także od około 50% substancji żywicznych rozpuszczonych w eterze (tabl. II, III) szkodliwych dla drożdży. Przy zastosowaniu tej metody straty substancji redukujących nie przekraczają 6% (5,8%), a pentoz— 9% (9,2%).
3. Wyodrębniony w naszym Zakładzie szczep *Torula utilis* osiągnął wydajność plonu = 43,4 — 65,9% w stosunku do zużytego cukru w czasie 12-godzinnej fermentacji hydrolizatu oczyszczonego, przeprowadzonej w następujących warunkach: ilość substancji redukujących w hydrolizacie—1,4%, ilość szczepionki w stosunku do ilości cukrów — 12% suchej masy. Pożywki azotowej — 5,5%, fosforowej — 12,5%. Nawietrzanie regularne (tabl. IV).
4. Wyniki powyższe uzyskane w warunkach laboratoryjnych wymagają potwierdzenia w skali półtechnicznej.
5. Potrzebne jest dalsze opracowanie zagadnienia przyswajalności pentoz i ustalenie bilansu azotowo-fosforowego.

Я. Якубовска, Ю. Мокржицки, К. Немыски и З. Беднарек

ПОЛУЧЕНИЕ КОРМОВЫХ ДРОЖЖЕЙ ИЗ ГИДРОЛИЗАТОВ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ГИДРОЛИЗА СОСНОВОЙ ДРЕВЕСИНЫ ПРОИЗВЕДЕННОГО ПО „СЕРНОКИСЛОМУ МЕТОДУ"

Р е з ю м е

Авторами установлено, что гидролизаты сосновой древесины, полученные в процессе облагораживания целлюлозных масс, могут быть использованы для продукции кормовых дрожжей (табл. I).

Исходные исследования были сведены к переработке полученных гидролизатов, удаляя из них фурфурол, а также ограничивая по мере содержание в них смолистых веществ.

Сначала гидролизаты подвергались нейтрализации аммиаком и известковой водой, а затем путем воздействия суперфосфата и серной кислоты кислотность смеси повышалась до величины pH 4,5. Смешивание и очищение гидролизата проводилось в течение трех часов при помощи распыленного воздуха (табл. II и III).

Окончательные результаты лабораторных исследований выразились в получении от 43,4 до 65,9% дрожжевой массы из 100 г использованного сахара (табл. IV).

Выше описанные лабораторные опыты требуют, по мнению авторов, технологической проверки в полутехническом масштабе.

J. Jakubowska, J. Mokrzycki, K. Niemyski and *Z. Bednarek*

PRODUCTION OF FODDER YEAST IN THE PINE WOOD HYDROLYZATES

Summary

The authors have studied the suitability of pinewood hydrolyzates for the production of fodder yeast.

Fifteen samples of wood hydrolyzates were examined. The hydrolyzates were prepared by following procedure. The relation of the amount of the liquid to this of the wood was 5:1; 0,20—0,32% of sulphuric acid was added. The initial temperature of hydrolysis — 60°, the maximal one — 120—130° during 2—3 hours (Table I).

The authors have elaborated a procedure of purifying of hydrolyzates. The growth inhibiting substances, furfural, rezine, formic and acetic acids were removed by increasing the alkalinity with ammonia and cream of lime. The liquid was then acidified by addition of superphosphate and of sulphuric acid (pH = 4,5). During this treatment the liquid was aerated (Tables II and III).

The strain of *Torulopsis utilis* was employed. It was examined the influence of the size of inoculum, the duration of the fermentation and aeration on the yield of yeast.

The yield of dry yeast in 12-hours fermentation was 43,4 to 65,9 per cent based on the sugar used.

Reducing sugars remaining after wood hydrolyzates were fermented, amounted to 0,35—0,8% (Table IV).

LITERATURA

1. Anonim, 1946: Scukrzanie drewna. *Przegląd Chemiczny*, 1/2:40, 1947. Ref. The Industrial Chemist.
2. Dörr R. E., 1939, 1940, 1941: Zellstoff und Zellwolle — ein Zelluloseproblem. *Papierfabrikation*, 1939, **37**:1, *Angewandte Chemie*, 1940a, **53**:13, *Angewandte Chemie*, 1940b, **53**:202, *Jentgens Zellwolle u. Kunstseide*, 1940c, **22**:279, *Papierfabrikation*, 1941, **39**:267.
3. Giwartowski E. i Plewako F. A., 1952: Technologia drożdżownictwa, PWRL, Warszawa.
4. Illig, 1950: Stroh u. Kiefernholzvorhydrolizat liefern Eiweissnähr- und Futtermittel. Die Polygraphische Industrie, **1**:51.
5. Krach H., 1951: Wykorzystanie odpadków drzewnych na drodze hydrolizy oraz przerób hydrolizatu na drożdże. Praca dyplomowa, rękopis w Bibliotece Inst. Cel.-papiern. w Łodzi.
6. Lodder J., 1934: Anaskosporogenen Hefen II, Uitgave van de N. W. Noord Hollandsche Uitgevers-Maatschappij. Amsterdam.
7. Lütz L., 1942: Traité de Cryptogamie. Paryż, Masson.
8. Plewako E. A. i Czeban M. E., 1935: Biołogiczeskije nabliudienia nad drożdżewymi gribkami, utilizirujuszczymi pientozy. *Mikrobiologija*, **4**:86.
9. Phrix-Gesellschaft. Raporty po-niemieckie 1941—1944, niepublikowane, Biblioteka Instytutu Cel.-papierniczego w Łodzi.
10. Smirnow W. A., 1948: Tiechnołogija gidroliznogo proizwodstwa, Moskwa.
11. Sohn A. W. und Lenel P. O., 1949: Über die Reaktionsprodukte einer schonenden partiellen Holzhydrolyse. *Das Papier*, 1949:109.
12. Surewicz Wł., 1950: Otrzymywanie mas celulozowych uszlachetnionych. *Przegląd Papierniczy*, **6**:75.
13. Surewicz Wł., 1951: Hydroliza wstępna drewna sosnowego za pomocą rozcieńczonych roztworów kwasu siarkowego. *Przegląd Papierniczy*, **7**:186, 233, 258, 279.
14. Szarkow W. J., 1950: Gidroliznoje proizwodstwo, Moskwa.
15. Verein der schwedischen Papier u. Zellstoffingeniere. 1942: Technischemitteilungen, Serie C.C.A. II.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

H. Zaorska i *S. Zagrodzki*

BIOLOGICZNA SYNTEZA BIAŁKA Z ODSOLONEGO WYWARU MELASOWEGO

Z Zakładu Technologii Środków Spożywczych Politechniki Łódzkiej

WSTĘP

Biologiczna synteza białka nie jest kwestią nową. Od lat kilkudziesięciu hodujemy drożdże na najróżnorodniejszych węglowodanowych produktach ubocznych czy odpadkowych. Najpospolitszym dzisiaj surowcem jest melas buraczany (Żwirblanski, 1935), zawierający cukier, azot i niektóre sole konieczne do wzrostu mikroorganizmów (Klimowski i Stabnikow, 1950, Popow, 1949). Powszechnie również stosowane są ługi posiarczynowe i wszelkiego rodzaju hydrolizaty celulozy (Wojcieszak, 1949). Przez zastosowanie odpowiednich szczepów udało się ostatnio oprzeć syntezę biologiczną białka nie tylko na produktach węglowodanowych. Węgiel, wodór i tlen mogą być dostarczane komórkom drożdżowym zamiast w postaci cukrów także jako aldehydy, niektóre kwasy organiczne, gliceryna i etanol (Prescott i Dunn, 1949). Przykładem tego jest zdrożdżowanie wywaru melasowego. Wzmiankowany sposób ma nie tylko teoretyczne znaczenie, lecz został także zastosowany na skalę przemysłową. W NRD czynne są fabryki produkujące drożdże na bazie wywaru melasowego z dodatkiem soli mineralnych zawierających azot i fostor. Ogólnie możemy powiedzieć, że wiele ubocznych produktów przemysłowych, a nawet ścieków po odpowiednim przygotowaniu, wybraniu najlepiej pracującego szczepu, dodaniu pożywek mineralnych, koniecznych do rozwoju drożdży, przy zastosowaniu odpowiedniego pH i przy silnym nawietrzaniu nadaje się do biologicznej produkcji białka.

Laboratoryjne i ćwierćtechniczne próby zdrożdżowania wywaru melasowego w naszych warunkach dały całkowicie pozytywny rezultat (Zaorska, 1951). Sprawdzono metodę niemiecką i zmodyfikowano ją. Doświadczenia prowadzono w sposób następujący. Wywar melasowy po dekantacji i rozcieńczeniu do 10° Bx zakwaszano kwasem siarkowym do pH 4, ogrzewano w ciągu 15 minut do wrzenia, sączono i sterylizowano. Pożywki (sole amonowe i fosforowe) dodawano w roztworze w czasie fermentacji. Po doświadczeniach prowadzonych z różnymi szczepami najlepsze rezultaty uzyskano z *Candida arborea*.

Stosowany wywar melasowy miał skład następujący:

pozorna zawartość substancji suchych	8,5° Bx
kwasowość	0,6° D
pH	5,5
azot całkowity	4,02 g na litr
azot amonowy	0,12 g na litr
P_2O_5	0,08 g na litr
popiół	28,0% s.s.

Analiza popiołu wywaru melasowego:

K_2O	55,8%	CO_2	24,5%
Na_2O	6,2%	SO_3	5,4%
CaO	1,8%	Cl	4,5%
MgO	0,3%	SiO_2	0,5%
Fe_2O_3	0,2%	P_2O_5	0,4%

nie określonych — 0,4%

W celu umożliwienia przyswojenia przez drożdże kwasów organicznych, związanych w wywarze, dodawano na litr 5,4 g 100% H_2SO_4, co powodowało podwyższenie stężenia jonów wodorowych. Jako pożywkę stosowano 0,3 g siarczanu amonu i 3,6 g superfosfatu na litr. Azot, zawarty w wywarze melasowym, został wykorzystany w 17,6%, co jest zgodne z danymi literatury (S t u c h l i k, 1951).

Najlepszy nawet sposób zużytkowania organicznych związków wywaru melasowego ma jednak ujemne strony. Tracimy mianowicie znaczne ilości soli potasowych, co wynika jasno z przytoczonej analizy popiołu wywarowego. Wysokie zużycie kwasu siarkowego (produkt deficytowy), niezbędnego do produkcji drożdży z wywaru, należy również zaliczyć do stron ujemnych.

Dotychczas istniały dwie drogi zużytkowania wywaru melasowego (Z a g r o d z k i, 1951). Jedna, to spalenie wywaru, ługowanie tzw. węgla wywarowego i następna rafinacja. Przy tej metodzie tracimy wszystkie związki organiczne zawarte w wywarze. Drugi kierunek, to zdrożdżowanie wywaru, czyli otrzymanie wysokobiałkowej paszy, natomiast strata cennego potażu. Sposób pierwszy stosuje się w Polsce w kilku większych gorzelniach. Wymaga on kosztownego urządzenia, jakim jest wyparka miedziana (kwaśny charakter wywaru), oraz pieca wywarowego.

Dla racjonalnego wykorzystania wywaru należałoby uprzednio rozdzielić niecukry organiczne od nieorganicznych (Z a g r o d z k i, 1951). Przeprowadzane nad tym zagadnieniem prace poszły w naszym Zakładzie w trzech kierunkach.

Pierwszy sposób, dokładnie opracowany teoretycznie, polega na odwodnieniu metodą azeotropową wywaru zakwaszonego H_2SO_4 i następnej ekstrakcji selektywnymi rozpuszczalnikami, np. wodnym azeotropem pirydyny. Otrzymuje się różne związki organiczne i jako pozostałość siarczan potasu i sodu.

Drugi sposób polega na elektrolizie wywaru melasowego. Przy tej metodzie omija się uciążliwe zagęszczanie wywaru. Z elektrolizy otrzymujemy wysokoprocentowy ług, który po saturacji gazem fermentacyjnym daje potaż techniczny o wysokiej czystości. Z pozostałej części wywaru można wykorzystać organiczne niecukry. Wywar po elektrolizie posiada niskie pH, nadaje się więc do zakwaszania melasu przed fermentacją. W ten sposób zaoszczędza się kwas siarkowy, nie wprowadza dodatkowych ilości siarczanów i przedłuża trwałość aparatury.

Analogiczny rezultat możemy otrzymać (trzeci sposób) odsalając wywar za pomocą kationitów, gdzie zostają zatrzymane wszystkie nieorganiczne kationy, a także pewna ilość związków organicznych o charakterze zasadowym. Odsolony wywar ma znaczne stężenie kwasów organicznych oraz zawiera związki nie zdysocjowane (betaina i inne).

Wywar odsolony za pomocą kationitu wykazywał przy analizie następujące własności:

pozorna zawartość substancji suchej	7° Bx
pH	2,3—3,5
kwasowość	6—8° D
zawartość popiołu węglanowego na s.s.	4%

Wywar po elektrolizie:

pozorna zawartość substancji suchej	6,9° Bx
pH	3,6—4,9
kwasowość	2—4° D
zawartość popiołu węglanowego na s.s.	14—22%
azot całkowity	2,9—3,2 g na litr
P_2O_5	0,6—0,8 g na litr

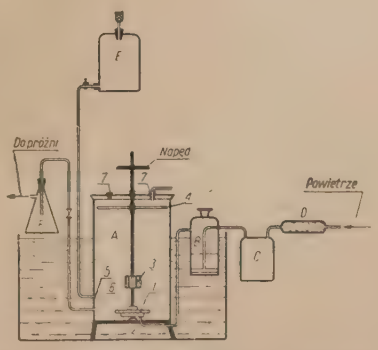
Najlepszym zastosowaniem wywaru odsolonego za pomocą kationitów lub metodą elektrolizy jest jego zdrożdżowanie. W stosunku do zwykłego wywaru, poddawanego zdrożdżowaniu, wywar odsolony ma tę wyższość, że nie potrzeba wtedy dodawać kwasu siarkowego. Kwasowość (niskie pH) wywaru odsolonego stwarza odpowiednie warunki rozwoju, a duże stężenie wolnych kwasów organicznych stanowi doskonały materiał do budowy masy komórkowej drożdży.

Opierając się na powyższych założeniach przystąpiono do wykonania doświadczeń nad zdrożdżowaniem wywaru odsolonego. Najlepszym rozwiązaniem każdego procesu technologicznego ze względu na maksymalną wydajność i doskonałe wykorzystanie aparatury jest metoda ciągła, (Bunker 1945, Schmidtowa, 1950) w tym też kierunku prowadzono pracę.

Jako surowca do zdrożdżowania używano wywaru po elektrolizie, który należało wzbogacić odpowiednio w azot i fosfor (Prescott i Dunn, 1949). Stosowano pożywki: siarczan amonu o zawartości 21% azotu i superfosfat o zawartości 17% P_2O_5 (Wojcieszak, 1949).

Spośród wielu przebadanych szczepów (Fiodorow 1949, Jorgensen 1940) najlepsze rezultaty otrzymano rozmnażając *Candida arborea*, należącą do rodziny *Torulopsidaceae*. Wprawdzie *Candida arborea* wymagała nieco wyższej optymalnej temperatury (32—35°) niż *Torulopsis*, ale była mniej wrażliwa na zakażenia i przy stosowaniu dużej ilości powietrza wykazywała najszybszy przyrost masy komórkowej.

Do pracy nad zdrożdżowaniem wywaru zaprojektowano specjalną aparaturę (rys. 1). Ponieważ drożdże potrzebują do syntezy swej masy wielkich ilości powietrza i najlepiej rozwijają się nie w cieczy, lecz w pianie, zwrócono na tę okoliczność specjalną uwagę i starano się wywar utrzymać w stanie intensywnego pienienia. Osiągnięto to dzięki zastosowaniu odpowiedniego systemu napowietrzania. Zdrożdżowanie przeprowadzano w miedzianej kadzi (A) w kształcie walca o pojemności 35 litrów, umieszczonej w łaźni wodnej o stałej temperaturze. Kadź zaopatrzono w przyrząd tworzący pianę (1), zbudowany na zasadzie mieszadła Furowicza, z modyfikacją polegającą na tym, że do cieczy w obiegu doprowadzono rurką (2) powietrze pod ciśnieniem. W 1/3 wysokości kadzi umieszczono dodatkowe mieszadełko łopatkowe (3), a 5 cm poniżej pokrywy śmigło (4) do zbijania nadmiernej piany. Do napędu uży-



Rys. 1. Schemat aparatury do zdrożdżowania wywaru melasowego

Рис. 1. Схема аппарата для выращивания дрожжей на мелассе

Fig. 1. The apparatus for growing yeast in the molasses residue

wano silnika elektrycznego po zastosowaniu odpowiedniej przekładni. Ilość obrotów wynosiła 380 na minutę. Powietrze prowadzono z kompresora przez filtr z watą (D) (o średnicy 8 cm, dł. 25 cm) celem zatrzymania zanieczyszczeń, a następnie przez gazomierz (C). Ponieważ duża ilość używanego powietrza powodowała odparowanie wywaru, zastosowano płuczkę wodną (B), umieszczoną w tej samej łaźni, co i kadź. Z gazomierza przez płuczkę doprowadzano powietrze miedzianą rurką, umieszczoną w dnie kadzi. Na wysokości 5 i 10 cm od dna przyspawano do zewnętrznej strony ścianki kadzi dwie krótkie rurki miedziane. Górna (5) służyła do doprowadzania wywaru, dolna zaś (6) do pobierania prób. Z wyskalowanej 10 litrowej butli (E) z dolnym tubusem, umieszczonej na półce ponad kadziami, doprowadzano wywar przez kranik i wąż gumowy. Rurka odprowadzająca z kadzi połączona była wężem gumowym z kranikiem z trzylitrową kolbą próżniową (F) wyskalowaną na 1000 ml. Rurka doprowadzająca brzeczkę, umieszczona w korku, sięgała do połowy wysokości kolby, natomiast boczny tubus w czasie pobierania próby łączono z próżnią. W pokrywie kadzi znajdowały się dwa otwory o średnicy 3 cm (7), przez które dodawano pożywkę oraz przy odpowiednim oświetleniu oglądano wnętrze kadzi.

Wywar odsolony otrzymany po elektrolizie poddawano dekantacji i sterylizacji. Wyciągi pożywek (siarczan amonu 6% i superfosfat 36%) przygotowano w butlach z dolnymi tubusami. Drożdże rozmnażano początkowo w laboratorium, następnie wprowadzano do propagatora, gdzie oprócz melasu dodawano wywar i silnie napowietrzano. Po 24 godzinach takiego rozmnażania pobierano z propagatora ok. 50 litrów brzeczki i prasowano. Otrzymane drożdże (ok. 25% s. s.) po zważeniu wprowadzano do kadzi z rozcieńczonym (4° Bx) wywarem i napowietrzano. Około 1 g drożdży brano do oznaczenia zawartości suchej substancji. Po 5 godz. rozpoczynano dodawać wywar odsolony w ilości 1 litra na dwie godziny.

Tabela I

Przebieg zdrożdżowania odsolonego wywaru melasowego

Ход процесса выращивания дрожжей на лишенной солей барде

Yield of yeast in the demineralised molasses residue

Okresy godzin zdrożdżowania	Bx	pH	Drożdże w g na litr	Azot amonowy w g na litr	Azot całkowity w g na litr	P_2O_5 w g na litr
Wprowadzany 1	6,9	4,5	—	0,200	2,932	0,069
wywar 2	6,7	4,0	—	0,186	2,320	0,063
0	5,0	4,5	6,7	0,170	1,672	0,672
7—13	5,4	4,8	7,2	0,180	1,620	0,532
15—21	5,6	5,0	7,8	0,160	1,912	0,466
23—29	5,5	5,1	8,2	0,116	2,228	0,408
31—37	5,4	5,2	8,6	0,064	2,751	0,342
39—45	5,4	5,1	9,0	0,020	2,841	0,306
47—53	5,3	5,1	9,0	0,018	2,560	0,288
55—60	5,3	5,9	9,2	0,018	2,545	0,272

Po upływie następnych dwóch godzin zaczynano odbieranie wywaru również w ilości 1 litra na dwie godziny. Wywar badano każdorazowo pod mikroskopem, oznaczano Bx, kwasowość, pH i zawartość drożdży. Resztę zlewano do butli i zbierano w ilości 4 litrów, czyli co osiem godzin przeprowadzano wszystkie analizy ze średniej próby.

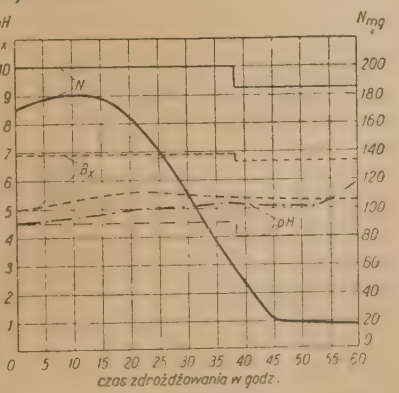
Stosowano ogólnie przyjęte metody analityczne (Wojcieszak, 1949).

Przytaczamy opis jednego z doświadczeń, które przeprowadzono nad zdrożdżowaniem wywaru po elektrolizie.

Użyto 22 litry wywaru o 6,9° Bx i pH 4,5 oraz 8 litrów wywaru o 6,7° Bx, pH 4,0. Do kadzi wprowadzono 250 g drożdży *Candida arborea* w przeliczeniu na 25% substancji suchej oraz 5 litrów wywaru i 4 litry wody. Siarczanu amonu dodano 2,7 g, a superfosfatu 32,4 g. Utrzymywano temperaturę 35°. Po 5 godzinach doprowadzono litr wywaru oraz 0,3 g siarczanu amonu i 3,6 g superfosfatu. Po siedmiu godzinach odebrano litr próby i następnie dodano litr wywaru oraz pożywki. Analogicznie postępowano co dwie godziny. Z każdej próbki wykonywano bieżące analizy kontrolne. Cztery próby zbierano do jednej butli, a następnie przeprowadzano średnie analizy. Po upływie 53 godzin dodano ostatni litr wywaru oraz pożywki, a po 55 godzinach pobrano ostatnią próbę. Zdrożdżowanie prowadzono jeszcze przez następne 5 godzin, czyli doświadczenie trwało w sumie 60 godzin. Drożdże pozostałe w kadzi były zdrowe i wykazywały bardzo duży procent komórek pączkujących.

Dokładny przebieg zdrożdżowania oddaje tabela I.

Na załączonym wykresie (rys. 2) przedstawiono w postaci linii prostych Bx, pH i azot amonowy wywaru po elektrolizie wprowadzanego do zdrożdżowania. Odpowiednie krzywe podają wyniki otrzymane z poszczególnych okresów zdrożdżowania wywaru wypływającego z kadzi. Obniżenie pozornej zawartości substancji suchej (z 6,9 Bx i 6,7 Bx do 5,6 Bx i 5,3 Bx) oraz podwyższenie pH (z 4,5 i 4,0 do 5,0 i 5,9) świadczą o przyswajaniu przez drożdże kwasów organicznych zawartych w wywarze. Spadek zawartości azotu amonowego wskazuje na dobre wykorzystanie przyswajalnego azotu.



Rys. 2. Przebieg zdrożdżowania odsolonego wywaru melasowego

Рис. 2. Ход процесса выращивания дрожжей на лишенной солей мелассе

Fig. 2. Yield of yeast in the „demineralised" molasses residue

Otrzymane drożdże miały następujący skład w odniesieniu do substancji suchej:

azot	7,96%
białko	49,75%
P_2O_5	5,1%

Jak wynika z powyższych zestawień, zdrożdżowanie wywaru po elektrolizie nie tylko przebiega dobrze, ale bez użycia kwasu siarkowego pozwala na otrzymanie 9,2 g s. s. drożdży z litra. Uzyskany rezultat można uważać za zupełnie zadowalający, tym więcej że wyniki są nieco lepsze aniżeli przy zdrożdżowaniu zwykłego wywaru z dodatkiem kwasu siarkowego. Tabela II daje porównanie wyników zdrożdżowania wywaru po elektrolizie i zakwaszonego wywaru nie odsolonego.

Tabela II

Wyniki zdrożdżowania wywaru po elektrolizie i zakwaszonego wywaru nie odsolonego

Результаты выращивания дрожжей на барде после электролиза и на подкисленной не лишенной солей барде

Yield of yeast in demineralised molasses residue by electrolysis and in untreated acidified molasses residue

	Wywar po elektrolizie	Wywar zakwaszony
Zawartość s.s. w g na 1 litr	67,6	73,7
Przyrost drożdży w g na 1 litr	9,2	8,7
Wydajność s.s. drożdży w g na 1 kg s.s. wywaru	136,2	118,0
Ilość dodanego 100% H_2SO_4 w g na 1 litr	0,0	5,4
Procentowe zużycie H_2SO_4 na drożdże	0,0	61,8
Procentowe wykorzystanie całkowitego azotu do syntezy biologicznej białka	22,89	17,60

Z przeprowadzonych doświadczeń można wyciągnąć następujące wnioski. Odsolony wywar jest dobrym surowcem do syntezy biologicznej białka i daje lepsze wyniki niż wywar zwykły, stosowany do tego celu. Jeśli uwzględnimy, że do produkcji drożdży tą metodą niepotrzebny jest dodatek kwasu siarkowego, należy stwierdzić znaczne korzyści gospodarcze, tym więcej że kwas siarkowy jest produktem deficytowym.

W zakończeniu należy przypomnieć, że przez zastosowanie jednej z metod odsalania wywaru wykorzystujemy w znacznym procencie potas, zawarty w wywarze w postaci cennego węglanu (K_2CO_3).

Zdrożdżowanie wywaru prowadzone dotychczasowymi sposobami wykorzystywało jedynie związki organiczne, powodując stratę całego potasu jako siarczanu, który odpływał z fabryki w ściekach. Nowa metoda pozwala na równoczesne wykorzystanie związków nieorganicznych w postaci potażu oraz organicznych do syntezy biologicznej białka. Po wykonaniu odpowiednich prób w skali półtechnicznej i fabrycznej będzie ona mogła stanowić poważny postęp w wykorzystaniu ubocznych produktów przemysłu spirytusowego.

Г. Заорска и С. Загродски

БИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ БЕЛКОВ ИЗ ЛИШЕННОЙ СОЛЕЙ БАРДЫ

Резюме

На лишенной солей барде выращивались дрожжи непрерывным способом. Использованный штамм *Candida arborea* ассимилировал приблизительно четвертую часть общего азота, имеющегося в барды. Прирост сухой массы дрожжей составлял 14% сухой субстанции барды. Процесс выращивания дрожжей на лишенной солей барде протекает очень хорошо и не требует прибавляния серной кислоты.

H. Zaorska and *S. Zagrodzki*

THE PRODUCTION OF FODDER YEASTS FROM MOLASSES RESIDUE WITH PREVIOUS REMOVING OF SALTS

Summary

The fodder yeast was produced from molasses residue after previous removing of salts.

The strain of *Candida arborea* employed by the authors assimilated ca 25% of nitrogen contained in the residue. The yield of dry yeast amounted to 14% of the dry mass of the medium. (Fig. 2, Tables I and II).

There was observed good growth of the yeast without addition of sulphuric acid.

LITERATURA

1. Bunker L., 1945: Fooder Yeast Plants I. G. Farbenindustrie, Wolfen.
2. Fiedorow M. W., 1949: Mikrobiołogija, Sielchozgiz, Moskwa.
3. Jorgensen A., 1940: Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie, 6. wyd., G. Fischer, Jena.
4. Klimowski D. N. i Stabnikow W. N., 1950: Tiechnołogija spirtowogo proizwodstwa, Piszczepromizdat, Moskwa.
5. Popow W. I., Dobrosjerdow Ł. Ł., Stabnikow W. N. i Andriejew K. P., 1949: Oborudowanie brodilnych proizwodstw, 2 wyd. Piszczepromizdat, Moskwa.
6. Prescott S. C. and Dunn C. G., 1949: Industrial microbiology, wyd. 2, Mc Graw-Hill Book Co, Nowy Jork.
7. Schmidtowa L., 1950: Fermentacja ciągła. *Przem. rolny* **4**:15.
8. Stuchlik V., 1951: Znaczenie azotu przyswajalnego w melasach dla przemysłu drożdżowego oraz jego oznaczanie. *Prúmysl potravin* **2**:345.
9. Wojcieszak P., 1949: Przemysł fermentacyjny. Kalend. techn. przem. spożywczego t. **2**, Warszawa.
10. Zagrodzki S., 1951: Wykorzystanie produktów ubocznych przemysłu melasowego. *Przem. rolny*, **5**:116.
11. Zaorska H., 1951: Zdrożdżowanie wywaru melasowego. Praca nie publikowana, GIPRiS.
12. Żwirblanski J. M., 1935: Otchody swiekłosacharnogo proizwodstwa, Moskwa.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

Z. Bednarek

WSTĘPNE PRÓBY HODOWLI *OIDIUM* NA HYDROLIZACIE DREWNA SOSNOWEGO

Z Zakładu Fizjologii Roślin i Mikrobiologii Uniwersytetu w Łodzi

WSTĘP

W związku ze skłonnością do zakażeń kultury drożdży, prowadzonej na pożywkach hydrolizatowych przez grzybek z rodzaju *Oidium*, powstał projekt przeprowadzenia obserwacji rozwoju i prób hodowli *Oidium* na tym podłożu.

W literaturze zagranicznej są wzmiankowane próby hodowania różnych szczepów *Oidium* na hydrolizatach lub ługach posulfitowych oraz zastosowania ich jako „drożdży" paszowych dla trzody i drobiu.

Obserwacje zebrane w poniższym streszczeniu należy uważać za wstępne i orientacyjne dla ewentualnej dalszej pracy, mającej na celu próby zastosowania *Oidium* do hodowli „drożdży" paszowych na hydrolizacie.

Tematem pracy było: 1) sporządzenie z surowego hydrolizatu pożywki nadającej się do hodowli *Oidium*; 2) oznaczenie ilościowe podstawowych składników sporządzonej pożywki; 3) dobór szczepu zdolnego do wykorzystania zarówno heksoz, jak i pentoz zawartych w hydrolizacie; 4) obserwacja zależności wzrostu *Oidium* od stężenia pożywki; 5) określenie optimum pH i optimum temperatury dla hodowli *Oidium*; 6) określenie plonu *Oidium* oraz stopnia zużycia substancji redukujących w zależności od rozcieńczenia pożywki hydrolizatowej, użytej do hodowli; 7) oznaczenie zawartości azotu w suchej masie grzybni *Oidium*, wyhodowanej na pożywce hydrolizatowej.

METODYKA PRACY

Hydrolizatu do celów doświadczalnych dostarczało Centralne Laboratorium Celulozowo-papiernicze w Łodzi. Pochodził on ze wstępnej hydrolizy drewna sosnowego przy pomocy rozcieńczonego kwasu siarkowego.

Pożywkę hydrolizatową sporządzano wg metody przyjętej w pracy zespołowej — „Hodowla drożdży pastewnych na hydrolizacie drewna sosnowego" — Jakubowska, Mokrzycki, Niemyski i Bednarek (1953). Przerobienie hydrolizatu na pożywkę polegało na: 1) usunięciu szkodliwych substancji lotnych i koloidalnych, 2) zobojętnieniu i usunięciu nadmiaru kwasu siarkowego, 3) wzbogaceniu pożywki azotem i fosforem.

Poszczególne składniki pożywki hydrolizatowej oznaczano następującymi metodami:

1) substancje redukujące — w przeliczeniu na glukozę metodą Shoorla,
2) azot całkowity — metodą mikro-Kjeldhala,
3) fosfor — w przeliczeniu na P_2O_5 metodą miareczkową Sheffera,

4) jony SO_4'' — wagowo, przez wytrącenie jonami Ba'',
5) wolne kwasy — w przeliczeniu na H_2SO_4 miareczkowo,
6) pH — kolorymetrycznie (dokładność *ca* 0,3).

Do prób hodowlanych użyto szczep *Oidium* wyodrębniony z kiszonki ogórkowej, a więc szczep przystosowany do wzrostu na podłożu roślinnym.

Do posiewów używano wodnej zawiesiny oospor, zmywanych każdorazowo ze skosów agarowych. Posiewy wykonano jałowo, dodając pipetą jednakową ilość zawiesiny do każdej próby tej samej serii. Do wysiewów seryjnych używano buteleczek o objętości 50 ml, zawierających po 25 ml pożywki hydrolizatowej.

Optymalne wyniki rozwoju kultury określano na podstawie oceny cech morfologicznych, makroskopowo i mikroskopowo. Ze względu na micelarne formy i polimorfizm *Oidium* musiano zrezygnować z metody liczenia drobnoustrojów w komorze Thoma. Nie stosowano również stopniowego przyzwyczajania szczepu do pożywki hydrolizatowej, ponieważ już wstępne wysiewy dały wzrost *Oidium*, a poza tym przypuszczano, że szczep nie przyzwyczajony będzie mniej tolerancyjny wobec odchyleń od optymalnych warunków hodowli i dzięki temu pozwoli je wyraźniej określić. Do stwierdzenia przydatności różnych cukrów dla wzrostu *Oidium* zastosowano płynną pożywkę mineralną, zawierającą 0,1% $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% KH_2PO_4, 0,05% $MgSO_4$, wodę oraz 2% cukru. Spośród dwucukrów używano maltozy i laktozy, z heksoz — glukozy, z pentoz — ksylozy i arabinozy.

Poszczególne rozcieńczenia pełnej pożywki hydrolizatowej otrzymywano przez dodatek od 10 do 90% wody, przy czym kolejne rozcieńczenia różniły się między sobą 10% zawartością wody.

Za optymalne wyjściowe pH podłoża dla hodowli *Oidium* przyjęto takie stężenie jonów wodorowych, które zapewniało najbardziej obfity i czysty rozwój tego grzyba po wysiewie na pożywkę, eksponowaną uprzednio parę godzin na powietrzu. Opanowanie środowiska przez *Oidium*, a nie przez zakażenia przypadkowe, było w tych warunkach ułatwione wysiewem oospor, a następnie uzależnione od elektywnego działania pH podłoża. pH poniżej 5 otrzymywano przez zakwaszenie pełnej pożywki hydrolizatowej kwasem siarkowym, a pH powyżej 5 — przez alkalizowanie ługiem sodowym. Tym sposobem otrzymywano podłoża o pH = 3, 4, 5, 6, 7 i 8. Wartość pH określano przy pomocy wskaźników.

Przy ustalaniu optymalnej temperatury wzrostu wysiane kultury hodowano w temperaturze: pokojowej, 26°, 28°, 30°, 32° i 40°, na pożywce hydrolizatowej, doprowadzonej ługiem do pH 5,5, które to pH uznano w poprzednim doświadczeniu za zbliżone do optymalnego. Obserwacje wzrostu przeprowadzono po 20 i 48 godzinach hodowli.

Plon hodowli *Oidium* na hydrolizacie i stopień zużycia substancji redukujących w zależności od rozcieńczenia pożywki określano na podstawie następującego doświadczenia: Do dwóch kolb Erlenmeyera nalano po 200 ml pożywki hydrolizatowej w warstwie o wysokości ca 2 cm. Jedna kolba zawierała pożywkę o pełnym stężeniu, a druga pożywkę rozcieńczoną dwukrotnie wodą studzienną. pH obu pożywek nastawiono na 5,5. Po sterylizacji pożywki zaszczepiano paru kroplami zawiesiny oospor i inkubowano w temperaturze 26° tak długo, jak długo stwierdzano przyrost grzybni. Temperatura stosowana w czasie hodowli była niższa od uznanej za optymalną, co miało zapobiec masowemu obumieraniu komórek w strzępkach przy długotrwałej hodowli. Po każdej dobie inkubacji obie kolby wstrząsano w celu: 1) równomiernego wymieszania składników pożywki, 2) ułatwienia wymiany gazów między pożywką a powietrzem, 3) strącenia z powierzchni pożywki starego kożuszka i umożliwienia wzrostu nowej grzybni w warunkach tlenowych (podobną metodę stosowali w swych pracach Plewako i Czeban).

Po zakończeniu hodowli plon grzyba odsączano nad próżnią. W przesączu oznaczano zawartość pozostałych substancji redukujących, a w grzybni — zawartość suchej masy. Otrzymane wyniki przeliczano na 1 litr pożywki. Zawartość azotu w suchej masie grzybni oznaczano metodą Kjeldhala.

WYNIKI

Sporządzona pożywka hydrolizatowa zawierała: substancji redukujących — 25,75 g/l, azotu całkowitego — 1,967 g/l, fosforu — 1,12 g/l, jonów SO''_4 —6,015 g/l, wolnych kwasów — 4,5 g/l. Poza tym przy podgrzewaniu pożywki wykryto odczynnikiem Tollensa ślady lotnych substancji redukujących oraz papierkiem azolitminowym — obecność kwasów lotnych. pH otrzymanej pożywki, oznaczone kolorymetrycznie, wynosiło 5.

Wyodrębniony szczep *Oidium* po wysiewie na pożywkę mineralną z cukrami wykazywał po 20-i 48-godzinnej hodowli w temperaturze 28° obfity wzrost na podłożu z glukozą, nieco słabszy wzrost na podłożu z ksylozą. Na innych cukrach (laktoza, maltoza, arabinoza) nie zaobserwowano wzrostu w warunkach doświadczenia. Wiele z ogólnej liczby komórek kożuszka, wyrosłego na podłożu z ksylozą, miało końce zaokrąglone lub kształt owalny, czego nie spotykano w preparacie z kożuszka wyrosłego na podłożu z glukozą.

Hodowla *Oidium* prowadzona na szeregu rozcieńczeń pożywki hydrolizatowej, obserwowana po 24 i 48 godzinach inkubacji w temperaturze 28°, wykazała ogólnie, że:

1) pożywka o pełnym stężeniu nie hamuje wzrostu grzybni;

2) warunki głodowe, utrudniające tworzenie zwartego kożuszka grzybni, istnieją już przy trzykrotnym rozcieńczeniu pożywki wyjściowej, to znaczy przy zawartości substancji redukujących poniżej 8 g/l;

3) w warunkach głodowych powstaje na powierzchni zaledwie cienka płatowata błonka z szeroką strefą strzępków zwisających w głąb pożywki, a na dnie luźny osad strzępków. Im większe rozcieńczenie pożywki, tym mniejszy ogólny przyrost grzybni i strzępki są bardziej równomiernie rozmieszczone w całej objętości pożywki.

Obserwacja wysiewów *Oidium* na podłożach hydrolizatowych o różnym pH po inkubacji 16-i 48-godzinnej w temp. 28° wykazała, że duża kwasowość aktywna podłoża (pH = 4) opóźnia powierzchniowy rozwój grzybni *Oidium*, sprzyja tworzeniu wewnątrz pożywki drobnych, sferycznych kolonii o promieniście ułożonych strzępkach i nie dopuszcza do rozwoju zakażeń bakteryjnych.

W odczynie obojętnym lub słabo alkalicznym kożuszek powstaje szybko, lecz obserwacja mikroskopowa, szczególnie wnętrza pożywki, wykazuje bujny rozwój mikroflory bakteryjnej (ziarniaki, pałeczki). Najobfitszy i względnie czysty rozwój *Oidium* obserwowano w granicach pH 5 — 6. Makroskopowo kultura przedstawiała się jako szarokremowy, skórzasty, pomarszczony kożuszek z wąską strefą strzępków zwisających pod kożuszkiem. Z wyjątkiem kłaczkowatego osadu strzępków na dnie pożywka pozostawała klarowna. W preparacie z kożuszka 16-godzinnej kultury dominowały krótkie, grube, parokomórkowe strzępki, między którymi spotykano dużo komórek podeszwowatych, esowatych oraz owalnych, grubo obłonionych. W preparacie z osadu obserwowano pojedyncze owalne komórki oraz cienkie, nitkowate strzępki z dużą ilością komórek martwych (barwiących się błękitem metylenowym). Po 48 godzinach inkubacji przy pH pożywki $\pm$ 6 prócz obfitego wzrostu grzybni *Oidium* stwierdzono zmętnienie pożywki. Preparat mikroskopowy wykazywał obecność bakterii (ziarniaki, pałeczki). We wszystkich próbach, w miarę rozwoju drobnoustrojów, obserwowano obniżenie pH, być może wskutek fizjologicznie kwaśnego charakteru podłoża (siarczany).

Obserwacje kultur po hodowli 20- i 48-godzinnej w różnych temperaturach wykazały, iż *Oidium* daje najszybszy wzrost i najobfitszy plon w temperaturze 30°. Przy 32° następowało częściowe zahamowanie wzrostu i zwiększona śmiertelność (po 48 godz.). Przy 40° wzrostu nie zaobserwowano. Temperatury hodowli poniżej 30° powodowały pewne opóźnienie wzrostu na powierzchni pożywki, w temperaturach tych wykrywano w kożuszku stosunkowo małą ilość komórek barwiących się błękitem metylenowym.

Wyniki hodowli, prowadzonej w celu określenia plonu *Oidium* oraz stopnia zużycia substancji redukujących w zależności od ich stężenia w pożywce hydrolizatowej, podaje poniższa tabela:

Tabela I

Hodowla *Oidium* na hydrolizacie

Влияние разбавления среды на выход *Oidium* и на степень использования восстанавливающих субстанций

The effect of the concentration of the hydrolyzates on the availability of reducing sugars to *Oidium lactis*

	Zawartość subst. redukujących		Zużycie subst. reduk. w czasie hodowli		Plon suchej masy w g/l pożywki	Wydajność such. masy wyrażona w % subst. redukujących	
	przed hodowlą g/l	po hodowli g/l	g/l	w % ilości dostarczonej		zużytych	dostarczonych
pożywka nie rozcieńczona	25,75	7,23	18,52	71,9	8,023	43,3	31,1
pożywka rozcieńczona	12,87	3,40	9,47	73,6	4,091	43,2	31,8

Zawartość azotu w suchej masie grzybni *Oidium*, otrzymanej w podobnym doświadczeniu, wynosiła 9,4%.

WNIOSKI

1. Pożywka hydrolizatowa, sporządzona wg metody przyjętej w tej pracy, może być stosowana jako podłoże hodowlane dla *Oidium*.

2. Używany w pracy niniejszej szczep *Oidium* może w znacznym stopniu wykorzystywać heksozy i pentozy zawarte w hydrolizacie i dawać pokaźny plon grzybni o dużej zawartości azotu.

3. Zastosowanie rozcieńczonej pożywki do hodowli *Oidium* może zapewnić pełniejsze wykorzystanie cukrów zawartych w podłożu niż przy użyciu pożywki nie rozcieńczanej.

4. Ponieważ wzrost grzybni *Oidium* odbywa się głównie w postaci kożuszka na powierzchni pożywki, wobec tego rozcieńczenia pożywki, na których *Oidium* nie tworzy kożuszka, tracą wartość podłoża hodowlanego dla tego grzybka.

5. Elektywne działanie wyjściowego pH podłoża oraz duży wysiew *Oidium* mogą zapewnić względnie czysty i obfity wzrost grzybni na niesterylnej pożywce hydrolizatowej. Uwzględnienie tych czynników pozwala wyznaczyć praktyczne optimum pH dla hodowli tego grzybka.

6. Optymalna temperatura hodowli *Oidium* na hydrolizacie wynosiła około 30°. W temperaturze tej obserwowano intensywny przyrost grzybni i stosunkowo mały procent komórek barwiących się błękitem metylenowym.

З. Беднарек

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ПОПЫТКИ ВЫРАЩИВАНИЯ *OIDIM LACTIS* НА ГИДРОЛИЗАТЕ СОСНОВОЙ ДРЕВЕСИНЫ

Резюме

O. lactis размножается успешно на средах, приготовленных из гидролизатов сосновой древесины. Оптимальная температура 30°. Использование сахаров (гексоз и пентоз) больше в разбавленной среде (Табл. I).

Z. Bednarek

PROPAGATION OF *OIDIUM LACTIS* ON PINE-WOOD HYDROLYZATES

Summary

Pine-wood hydrolyzates were shown to be a good medium for growing *O. lactis*.

The optimal temperature 30°. The utilization of sugars (hexoses and pentoses) was better in diluted medium (Table I).

St. Bujak

WYKORZYSTANIE ODPADKÓW PRZEMYSŁOWYCH DO PRODUKCJI BIAŁKA PASZOWEGO

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИГОДНОСТИ ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТБРОСОВ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ БЕЛКОВЫХ КОРМОВ

UTILIZATION OF INDUSTRIAL WASTES FOR FODDER YEAST PROPAGATION

Z Zakładu Mikrobiologii Rolniczej U.M.C.S. w Lublinie

Praca ta należy do cyklu badań nad racjonalnym zużyciem produktów odpadkowych. W szczególności wynikła ona z potrzeby rozszerzenia bazy surowcowej do produkcji drożdży paszowych.

Badano produkcję *Torula utilis* i *Candida arborea* na ługach posiarczynowych i na wycierce ziemniaczanej. Określano optymalne warunki zużycia tych odpadków. Prócz wydajności plonu oznaczono jakość substancji azotowych.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

S. Zagrodzki i *W. Krzysztofik*

CIĄGŁA FERMENTACJA CYTRYNOWA MELASU PRZY UŻYCIU ANIONITU

Z Zakładu Technologii Środków Spożywczych Politechniki Łódzkiej

WSTĘP

Kwas cytrynowy jest naturalnym składnikiem wielu owoców. Występuje w soku cytryn, ananasów, pomarańcz, agrestu, czarnych jagód, porzeczek, malin, truskawek itp. Dawniej kwas cytrynowy otrzymywano na skalę techniczną z cytryn. Dzisiaj, kiedy roczne zapotrzebowanie światowe przekracza 14 000 t kwasu cytrynowego (Ost i Rassow 1952), produkcja jego opiera się przede wszystkim na metodzie fermentacyjnej.

W przemyśle prowadzi się fermentację cytrynową za pomocą odmian czarnego kropidlaka (*Aspergillus niger*), należącego do workowców (klasa *Ascomycetes*, rząd *Plectascales*, rodzina *Aspergillaceae*). Jest to bardzo rozpowszechniony mikroorganizm. *A. niger* odznacza się bogactwem enzymów, takich jak: amylaza, emulsyna, maltaza, proteaza, inulaza, tannaza oraz wielu innych, znajdujących się w mniejszych ilościach. W czasie fermentacji tworzy się kwas cytrynowy przy równocześnie powstających małych ilościach kwasu szczawiowego (Currie 1917, Bassalik 1949). Na wytworzenie kwasu cytrynowego, szczawiowego czy glukonowego wpływa nie tylko rodzaj szczepu użytego do fermentacji, ale również skład chemiczny stosowanej pożywki. Tak więc np. przy obniżeniu zawartości azotu wzrasta produkcja kwasu cytrynowego. Oprócz zasadniczych składników pożywki muszą zawierać odpowiednie pierwiastki śladowe (mikroelementy), np. Zn, Cu, Mn, Mo, Co, Ni itp., bez których grzybnia nie może się należycie rozwijać i wytwarzać potrzebnych enzymów (Kovats 1948, Bassalik 1949, Waksman i Karow 1948).

Fermentacja cytrynowa wymaga zatem odpowiedniego środowiska o pożądanym stężeniu jonów wodorowych oraz optymalnej temperatury. Do zakwaszenia używa się kwasu siarkowego lub solnego, doprowadzając pH do 5—6, a proces fermentacji prowadzi się w temperaturze 20 — 30° (Kovats 1949, Januszewicz 1949, Szybalski 1947). Otrzymywane wydajności kwasu cytrynowego na skalę techniczną wynoszą 50—60% w stosunku do wprowadzonego cukru. W miarę przebiegu fermentacji szybkość tworzenia kwasu cytrynowego przez grzybnię maleje. Przyczyną tego jest nagromadzanie się produktów metabolizmu grzybka, hamujących biologiczną syntezę kwasu cytrynowego. W procesie tworzenia się kwasu szkodliwie oddziaływa sam kwas cytrynowy i im wyższe stężenie wolnego kwasu, tym silniej zostaje zahamowany proces kwasotwórczy (Żurawski 1950). Częściowe zobojętnienie fermentujących roztworów wpływa niekiedy dodatnio i zwiększa wydajność kwasu cytrynowego o kilkanaście procent. W tym

celu używano do zobojętniania $CaCO_3$, NaOH oraz Na_2CO_3. Lepsze wyniki otrzymywano przy ciągłym doprowadzaniu do brzeczki nowej pożywki. Najlepsze uzyskano przez zastępowanie sfermentowanego roztworu świeżą pożywką.

Wszystkie omawiane tu prace doświadczalne i techniczne nad otrzymywaniem kwasu cytrynowego dotyczą metody powierzchniowej fermentacji, prowadzonej na tacach aluminiowych lub w specjalnych płaskich naczyniach, gdzie na powierzchni roztworu tworzy się grzybnia w postaci kożucha. Fermentacja powierzchniowa jest kłopotliwa i kosztowna, toteż ogólnym dążeniem badaczy jest opracowanie fermentacji cytrynowej wgłębnej (Martin i Waters 1952) (głębinowej), którą można prowadzić w naczyniach o dużej pojemności. Znany jest już od 1926 r. patent Bleyera (Bernhauer 1932) na fermentację wgłębną, która jednak nie została jeszcze powszechnie wprowadzona na skalę przemysłową (Loesecke 1945, Janusze-wicz 1949, Martin i Waters 1952). Rozwiązanie zagadnienia fermentacji głębinowej przy produkcji kwasu cytrynowego będzie niewątpliwie ważnym osiągnięciem w dziedzinie mikrobiologii technicznej.

Poważnym krokiem naprzód jest wprowadzenie modyfikacji powierzchniowej fermentacji cytrynowej przez zastosowanie metody ciągłej zamiast dotychczasowej periodycznej, co pozwoli na wytworzenie w przepływającym roztworze przy użyciu tej samej grzybni znacznie większych ilości kwasu cytrynowego. Jako surowca do tego celu używa się melasu. Pomimo pewnych trudności związanych z fermentacją cytrynową (Kovats 1947, Prumyslowa Actiova Společnost, 1941) melas po odpowiednim przygotowaniu z dodatkiem węgla aktywowanego nadaje się na podłoże do hodowli. Do fermentacji używany jest zwykle sterylizowany rozcieńczony melas o zawartości 15% cukru. Melas po zadaniu węglem aktywowanym, żelazocjankiem potasu i kwasem fosforowym zakwasza się kwasem siarkowym do pH = 5—6. Przygotowany roztwór (zacier) rozlewa się na tacach w warstwie od 4 do 8 cm, a następnie szczepi się konidiami *A. niger*.

BADANIA WŁASNE

Fermentacja cytrynowa melasu odsolonego za pomocą wymieniaczy jonów

Melasy z różnych cukrowni poddawane w tych samych warunkach fermentacji cytrynowej wykazywały niejednakową zdolność fermentacyjną (Kovats 1947). Celem zbadania przyczyny różnej zdolności fermentacyjnej były przeprowadzone próby uprzedniego oczyszczenia melasu, nie zawsze jednak dawały one zadowalające rezultaty. Z tych powodów podjęto badania fermentacji melasu uprzednio odsolonego (Prescott i Dunn 1941). Do odsolenia melasu zastosowano kationity polskie i amerykańskie, przy czym nie zauważono różnicy fermentacji w zależności od użytego kationitu. Natomiast wyraźnie zaznaczył się wpływ kwasowości melasu po odsoleniu albo inaczej mówiąc stopień odsolenia. Do odsalania stosowano melas rozcieńczony do 20° Bx o czystości 63, alkaliczny o pH=8,7. Melas całkowicie odsolony o czystości ponad 80, o kwasowości 0,4 n i pH = 2, nie wykazywał żadnych zdolności fermentacyjnych, a nawet na zobojętnionym amoniakiem melasie do pH = 6 grzybnie w żadnym wypadku się nie rozwijały. Melas odsolony w 60% (zawierający 40% kationów) o czystości 75, kwasowości 0,25 n i pH = 3,5 nie wykazywał żadnej zdolności fermentacyjnej, a zobojętniany amoniakiem do pH = 6 dawał spóźniony rozwój grzybni i bardzo słabo ulegał fermentacji.

Melas odsolony w 20% (zawierający 80% pierwotnego popiołu), o czystości 68, kwasowości 0,075 n i pH=4,5 nie wykazywał jeszcze żadnej zdolności fermentacyjnej, a nawet stwierdzono całkowity brak rozwoju grzybni. Dopiero zobojętniony amoniakiem do pH = 6 wykazywał normalną zdolność fermentacji cytrynowej.

Całkowitą zdolność fermentacyjną bez zobojętniania posiadał dopiero melas odsolony zaledwie w 4%, o czystości 64, kwasowości 0,01 n i pH = 5,8. Przy użyciu tego rodzaju melasu zauważono wyższą wydajność i lepszą zdolność fermentacyjną niż przy użyciu melasu nieodsolonego. Całkowicie oczyszczony za pomocą kationitu i anionitu melas o czystości 86, pomimo reakcji obojętnej i pH = 6,8, nie wykazywał żadnej zdolności fermentacyjnej i zupełny brak rozwoju grzybni.

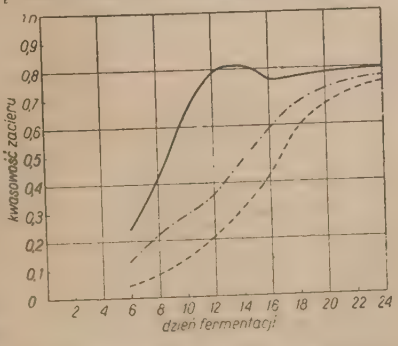
Negatywne wyniki przeprowadzanych badań są dlatego łatwo zrozumiałe, że nie tylko zakwaszenie melasu i usunięcie potrzebnych soli nieorganicznych, ale zmniejszone ilości poszczególnych pierwiastków śladowych uniemożliwia lub przynajmniej utrudnia rozwój grzybni. Przeciwnie, melas poddany działaniu samego anionitu wykazywał normalną zdolność fermentacyjną, a grzybnia na takim melasie doskonale się rozwijała.

Przeprowadzono próby porównawcze fermentacji cytrynowej zakwaszonego za pomocą HCl melasu nieoczyszczonego oraz takiego samego zadanego 1% węgla aktywowanego. Otrzymano o kilkanaście procent lepszą wydajność kwasu cytrynowego przy zastosowaniu węgla aktywowanego, przy czym wyniki były analogiczne jak przy zastosowaniu prawie nasyconych kationitów, kiedy odsolenie melasu nie przekraczało 4%. Należy sądzić, że węgiel aktywowany, kationit bliski nasycenia oraz zastosowany anionit bez kationitu spełniają rolę ciał adsorbujących związki koloidalne, zawarte w dość pokaźnych ilościach w melasie, które wpływają hamująco na proces fermentacji. Z tych przyczyn zastosowanie metod adsorpcyjnych jest celowe i godne polecenia.

Rozkład stężeń kwasu cytrynowego i gęstości fermentującej brzeczki na różnych głębokościach

Celem poprawienia wyników fermentacji powierzchniowej przez wprowadzenie fermentacji ciągłej należało zbadać stężenie kwasu cytrynowego na różnych poziomach fermentującego roztworu oraz jednocześnie porównać ciężar właściwy poszczególnych warstw roztworu w miarę przyrostu kwasowości.

Doświadczenie przeprowadzono w kolbie ssawkowej, stosując 60 mm warstwę fermentującego roztworu rozcieńczonego melasu. Roztwór zakwaszonego melasu posiadał początkowo 19,4° Bx, czystość 63, pH = 6; fermentację prowadzono w temp. 23° — 25°. Pomiary robiono na trzech poziomach 0, 30 mm i 60 mm (na dnie naczynia, w środku warstwy i bezpośrednio pod kożuchem grzybni *A. niger*). Próbki pobierano za pomocą kapilar na stałe umieszczonych na podanych poziomach. Tworzący się CO_2 usuwano przez zastosowanie lekkiego podciśnienia, które powodowało równomierną wymianę powietrza. Załączony rys. 1 podaje kwasowość na poszczególnych poziomach roztworu w czasie prowadzonej fermentacji powierzchniowej.

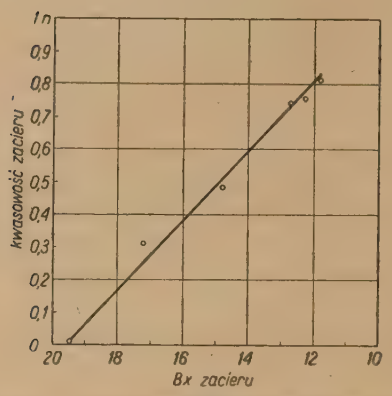


Rys. 1. Kwasowość różnych warstw zacieru w czasie fermentacji
— górna warstwa
— · — środkowa warstwa
- - - - dolna warstwa

Рис. 1. Кислотность разных слоев затора во время ферментации

Fig. 1. The acidity on various levels of the fermented medium during citric acid fermentation

Po 14 dniach górna warstwa roztworu osiągnęła maksymalną kwasowość — 0,805 n. Przegięcie krzywych po 16 dniach powstało na skutek pobrania większych próbek do analizy. Wyrównanie stężeń utworzonego kwasu cytrynowego na poszczególnych poziomach roztworu nastąpiło dopiero po 24 dniach. Dyfuzja w roztworze zachodzi wolno ze względu na znacznie większy ciężar właściwy brzeczki, o mniejszym stężeniu kwasu cytrynowego na dnie naczynia niż przefermentowanego roztworu pod grzybnią.



Rys. 2. Spadek gęstości (Bx) zacieru w zależności od kwasowości

Рис. 2. Понижение плотности (Bx) затора в зависимости от кислотности

Fig. 2. The relationship between changes in the density (Bx) of the fermented medium and changes in its acidity

Zależność między kwasowością i gęstością roztworu wskazuje rys. 2.

Wzrost kwasowości pociąga za sobą zmniejszenie Bx zacieru. Zamiana cukru na kwas cytrynowy w roztworze zmniejsza jego ciężar właściwy. Powoduje to zmniejszenie szybkości dyfuzji i utrudnia wyrównanie stężeń w poszczególnych warstwach roztworu przy fermentacji powierzchniowej. Szybkość dyfuzji jest znacznie mniejsza niż tworzenie się kwasu cytrynowego, skutkiem tego wysokie stężenie kwasu cytrynowego w górnej warstwie wpływa hamująco na cały proces fermentacji. Opierając się na tym można sądzić, że fermentacja ciągła i stały przepływ roztworu pod powierzchnią grzybni będzie ułatwiał wyrównanie stężeń i w ten sposób przyspieszy fermentację.

Fermentacja ciągła

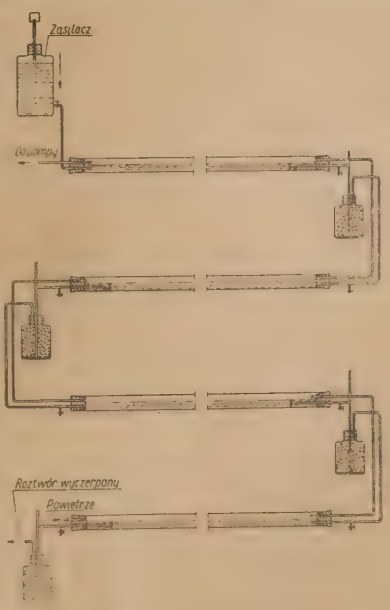
Proces ciągłej fermentacji cytrynowej melasu pomyślano w ten sposób, aby stale odprowadzać spod grzybni górną warstwę przefermentowanej brzeczki o największej zawartości kwasu cytrynowego, a od dołu wprowadzać odpowiednio przygotowany i zaopatrzony w pożywki rozcieńczony melas. Odprowadzenie warstwy powierzchniowej daje możność bezpośredniego zetknięcia się z kożuchem warstwy niższej, która kolejno staje się warstwą powierzchniową. W ostatecznym wyniku roztwór ulega fermentacji na całej głębokości, co wpływa na podniesienie wydajności i skrócenie czasu fermentacji. Dla osiągnięcia wysokiej wydajności odprowadzany roztwór musiałby posiadać całkowicie przefermentowany cukier i duże stężenie kwasu cytrynowego, co wpływałoby hamująco na proces fermentacji. Dla przyspieszenia procesu i dalszego podniesienia wydajności należałoby stale usuwać z roztworu tworzący się kwas cytrynowy. Dokonać tego można przez stałe zobojętnienie za pomocą $CaCO_3$, Na_2CO_3 itp.

W pracy naszej obrano inną drogę dającą wielostronne korzyści, a to wiązanie kwasu cytrynowego przez anionit. Niedopuszczenie do tworzenia się wysokich stężeń kwasu cytrynowego pod powierzchnią grzybni zwiększa szybkość fermentacji, skraca czas jej trwania, przesuwa równowagę w pożądanym kierunku i podnosi wydajność. Z drugiej strony niższe stężenie kwasu cytrynowego zmniejsza ilość tworzącego się kwasu szczawiowego, który przy fermentacji periodycznej

powierzchniowej powstaje pod koniec procesu fermentacji. Przy ciągłym systemie fermentacji zakwaszenie melasu jest zbędne, gdyż wprowadzając równomiernie świeży melas do fermentującego roztworu utrzymać można pożądane stężenie jonów wodorowych na skutek odpowiedniego stężenia kwasu cytrynowego.

Przy racjonalnym ciągłym procesie fermentacji powierzchniowej należy nie tylko stale wprowadzać świeży roztwór, a usuwać tworzący się kwas cytrynowy, ale również doprowadzać stale powietrze, usuwając tworzący się dwutlenek węgla. Grzybnia powinna być nieruchoma, pod grzybnią winien przepływać roztwór, z którego tworzący się kwas cytrynowy winien być wiązany i odprowadzany; nad grzybnią w przeciwnym kierunku powinno przepływać powietrze z dostateczną szybkością dla całkowitego odprowadzenia CO_2. Odpowiednio zaprojektowana aparatura zadość czyniła wszystkim wymienionym warunkom. Składała się ona z czterech rur szklanych 1 200 mm długich, o średnicy 40 mm, ustawionych poziomo nad sobą. Każda rura była napełniona do połowy roztworem melasu. Pomiędzy rurami znajdowało się naczynie napełnione anionitem, jak wskazuje rys. 3.

Rury zamknięto na końcach korkami o dwóch otworach dla przepływu brzeczki i powietrza. Dopływ roztworu melasu z górnego naczynia (zasobnika) regulowany był za pomocą ściskacza śrubowego. Roztwór ten wypływa już jako całkowicie wyzyskany z dolnego ostatniego naczynia napełnionego anionitem. Powietrze wchodziło do najniżej położonej rury, przechodziło nad grzybnią i płynąc kolejno w wyższych rurach odchodziło z najwyższej rury do pompy. Ilość powietrza mierzono za pomocą fleometru przed wprowadzeniem do rury. Ilość roztworu melasu mierzono w naczyniu zasilającym. Dla racjonalnego pobierania częściowo odfermentowanej brzeczki z warstwy cieczy pod grzybnią, każda rura posiadała odpowiedni przelew, którego fragment jest podany na rys. 4.



Rys. 3. Aparatura do fermentacji ciągłej
Рис. 3. Аппаратура для непрерывной ферментации
Fig. 3. Laboratory-scale apparatus for the continuous citric acid fermentation

Odpowiednio ustawiona rurka szklana w kształcie litery T umożliwiała regulowanie poziomu cieczy w połowie rury szklanej. Kraniki probiercze pozwalały na analizowanie roztworu po wypływie z rury (przed anionitem) oraz przed wejściem do następnej rury (po anionicie). W ten sposób zapewniono ciągłą pracę powierzchniowej fermentacji cytrynowej oraz dokładną kontrolę fermentacji. Wszystkie rury zostały zakryte czarnym papierem, aby zmniejszyć ujemny wpływ światła, a temperaturę fermentacji regulowano dokładnie za pomocą żarówek.

Celem zabezpieczenia anionitu przeznaczonego do wiązania kwasu cytrynowego od wiązania innych związków w roztworze po fermentacji cytrynowej roztwór melasu przed fermentacją przepuszczono przez kolumnę z anionitem.

Rys. 4. Fragment przelewu

Рис. 4. Фрагмент приспособления для перемещения ферментирующей жидкости из одной трубы в другую.

Fig. 4. The fragment of the fermentation-tube. The outlet.

Po napełnieniu rur do połowy pojemności roztworem oczyszczonego melasu z pożywką, po zakwaszeniu kwasem solnym do pH = 5,6 zaszczepiono w każdej rurze zarodniki *A. niger*. Szczep *A. niger* otrzymaliśmy z pracowni J. Kovatsa z Raciborza. Szczepienia dokonano przez wtryskiwanie zawiesiny specjalnym rozpylaczem o długości 500 mm przez górne otwory przeznaczone do przepływu powietrza. Po sześciu dniach, gdy kożuch już się rozwinął, rozpoczęto zasilanie górnej rury i uruchomiono ciągłą fermentację. Roztwór częściowo sfermentowany w pierwszej rurze przechodził przez wymieniacz jonowy (anionit), który zatrzymywał wytworzony kwas cytrynowy. Do następnej rury przechodził melas pozbawiony kwasu i o niższej zawartości cukru. Taki sam cykl następował w pozostałych rurach. Pobieranie próby z kurków probierczych pozwalało na dokładną kontrolę kwasowości. W razie ukazania się kwasu w roztworze po anionicie (przebicia) zastępowano napełniony wymiennik z anionitem nowym, świeżo zregenerowanym. Anionit nasycony kwasem cytrynowym przemywano wodą, wymywano kwas cytrynowy za pomocą HCl, a następnie regenerowano wodorotlenkiem sodu lub amonu. Po przemyciu wodą wymiennika z anionitem używano go znowu do wiązania kwasu cytrynowego z roztworu po fermentacji. W ten sposób zapewniono stałe usuwanie kwasu cytrynowego z roztworu między rurami.

Podstawowym zagadnieniem w procesie fermentacji ciągłej jest przyrost kwasowości w czasie przepływu brzeczki przez rurę fermentacyjną. Kwasowość brzeczki wypływającej z rury była zależna od szybkości przepływu przez rurę. Stosowaliśmy szybkości przepływu odpowiadające dwudniowej fermentacji w jednej rurze, a także czterodniowej lub ośmiodniowej. Dla zbadania optymalnej szybkości przepływu rurę napełnioną do połowy roztworem przygotowanego melasu zaszczepiono konidiami *A. niger* i wyhodowano grzybnię. Po sześciu dniach fermentacji periodycznej, przeznaczonej na rozwój kożucha, rozpoczęto fermentację ciągłą. Roztwór melasu uprzednio przepuszczony przez anionit wprowadzano do rury z szybkością 4-dobowej fermentacji, a także 2-dobowej oraz 8-dobowej. Poniższa tabela podaje wyniki fermentacji ciągłej, począwszy od siódmego do 32 dnia fermentacji. Górna rubryka podaje dzień fermentacji, środkowa—kwasowość wyrażoną w normalnym roztworze i wreszcie dolna—szybkość przepływu wyrażoną w ilości dni przebywania melasu w rurze w czasie fermentacji ciągłej.

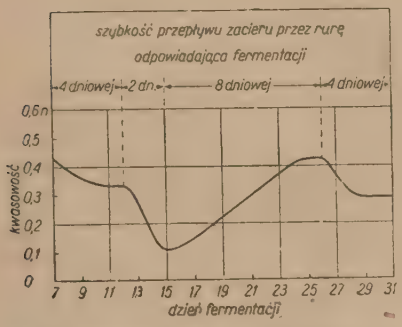
Dzień	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Kwasowość	0,431	0,390	0,377	0,340	0,330	0,331	0,232	0,196	0,106
Czas ferment. w dobach	4	4	4	4	4	4	2	2	2
Dzień	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Kwasowość	0,129	0,153	0,190	0,216	0,263	0,285	0,331	0,370	0,402
Szybkość	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Dzień	25	26	27	28	29	30	31	32	
Kwasowość	0,424	0,426	0,361	0,301	0,291	0,292	0,291	0,290	
Szybkość	8	8	4	4	4	4	4	4	

Z tabeli widać wyraźnie, jak zmienia się kwasowość w zależności od szybkości przepływu roztworu fermentującego, inaczej mówiąc, od czasu trwania fermentacji ciągłej. Początkowa kwasowość 0,431 n przy szybkości przepływu odpowiadającej 4-dobowej fermentacji spada stopniowo, ustalając się na poziomie 0,33 n. Zwiększenie przepływu do okresu dwudobowej fermentacji obniża kwasowość do 0,106 n. Przedłużając czas do ośmiodobowej fermentacji, czyli czterokrotnie wolniej przepuszczając rozcieńczony melas, otrzymuje się kwasowość, która powoli podnosi się do 0,426 n. Przy powrocie do pierwotnej szybkości przepływu, odpowiadającej czterodobowej fermentacji, kwasowość ustala się na poziomie nieco niższym — 0,290 n. Spadek kwasowości z 0,33 n (10 — 12 dzień) na 0,29 n (28 — 32 dzień) jest spowodowany prawdopodobnie starzeniem się grzybni. Zmiany kwasowości jeszcze wyraźniej widać na wykresie (rys. 5).

Od 7 do 12 dnia szybkość przepływu odpowiadała 4-dniowej fermentacji.
„ 12 „ 15 „ „ „ „ 2 „ „
„ 15 „ 26 „ „ „ „ 8 „ „
„ 26 „ 32 „ „ „ „ 4 „ „

Melas posiadał 18,1° Bx, czystość 63, średnia temperatura fermentacji wynosiła 25°, kwasowość oznaczano wobec fenolftaleiny. Optymalna szybkość przepływu przez rurę fermentacyjną odpowiada — jak widać — 4-dniowej fermentacji.

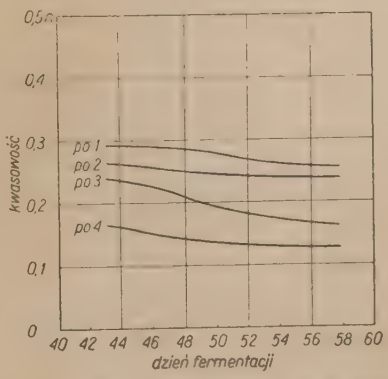
Po przeprowadzeniu wstępnych prób przystąpiliśmy do fermentacji ciągłej na aparaturze 4-rurowej (rys. 3), wiążąc otrzymany kwas cytrynowy za pomocą anionitu. Melas do fermentacji był analogicznie przygotowany jak uprzednio i posiadał ten sam skład, a fermentacja w rurach zachodziła na tej samej grzybni. Poniższy wykres (rys. 6) podaje wyniki fermentacji ciągłej w każdej rurze przy szybkości odpowiadającej 4-dobowej fermentacji. Kwasowość roztworu była mie-



Rys. 5. Zależność kwasowości zacieru od szybkości przepływu (czasu trwania fermentacji)

Рис. 5. Зависимость кислотности затора от скорости пропускания (продолжительности ферментации)

Fig. 5. The effect of the velocity of flow of fermented medium on its acidity



Rys. 6. Kwasowość zacieru czterorurowej fermentacji ciągłej przy wypływie z każdej rury

Рис. 6. Кислотность в каждой трубе при четверотрубной непрерывной ферментации

Fig. 6. Changes in the acidity of the fermented medium in each tube during continuous fermentation in four-tubes apparatus

rzona przy wypływie z każdej rury oraz po przejściu przez anionit, przy czym po przejściu przez anionit kwasowość roztworu zawsze równała się 0.

Sumując kwasowość zacieru z wszystkich rur w poszczególnych dniach, otrzymaliśmy kwasowość od 0,963 n do 0,778 n, co wynosi średnio 0,861 n.

Średnie wyniki analiz po przepływie przez poszczególne rury przedstawiały się następująco:

	Przed fermentacją	Po przejściu przez			
		I rurę	II rurę	III rurę	IV rurę
Ciężar właściwy	1,075	1,066	1,058	1,050	1,045
Bx	18,1	16,4	14,2	12,4	11,2
Zawartość cukru %	11,4	8,1	5,2	2,9	1,1
Zawartość kwasu szczawiowego %	—	—	0,18	0,23	0,27
Kwasowość	—	0,276	0,248	0,197	0,140

Ogólna średnia kwasowość sumaryczna ciągłej fermentacji wynosiła 0,861 n, co odpowiada 6,02 g kwasu cytrynowego w 100 ml roztworu. A zatem wydajność wynosiła średnio $\frac{6{,}02}{11{,}4} = 52{,}8\%$ cukru wprowadzonego z roztworem.

Celem wydobycia związanego przez anionit kwasu cytrynowego należało przemyć wymieniacze jonowe, a następnie przepuścić kwas solny lub siarkowy, który wypierał kwas cytrynowy i szczawiowy. W ten sposób można było rozdzielić kwas szczawiowy od cytrynowego (Zagrodzki, Krzysztofik i Gortel 1953). Do tego celu używaliśmy roztworu 3 n kwasu. Po zagęszczeniu pod próżnią i krystalizacji otrzymaliśmy kwas cytrynowy w postaci białych kryształków. Dla produkcji cytrynianu sodowego wystarczy przepuścić przez anionit roztwór Na_2CO_3 lub NaOH, a w rezultacie otrzymuje się cytrynian sodowy i zregenerowany anionit do ponownego użycia. W tym wypadku stosowanie kwasu solnego lub siarkowego jest niepotrzebne.

Powtarzając tę metodę doświadczenia nad fermentacją ciągłą, posługiwaliśmy się bez przerwy tą samą grzybnią, która pracowała w ciągu dwóch miesięcy bez ponownego szczepienia konidiami. W czasie fermentacji zauważono kilkakrotnie wytwarzanie się nowych pokoleń grzyba, co mogło wpłynąć na odradzające się zdolności kwasotwórcze kożucha. Pod koniec jednak drugiego miesiąca zaobserwowano spadek zdolności fermentacyjnej, co spowodowało obniżenie wydajności. Prowadzona w ten sposób ciągła fermentacja cytrynowa z punktu widzenia technologicznego dawała dobre rezultaty, jednak pod względem mikrobiologicznym posiadała pewne braki, których usunięcie mogłoby dodatnio wpłynąć na wydajność produkcji kwasu cytrynowego. W celu porównania otrzymanych wyników z wynikami fermentacji powierzchniowej, prowadzonej periodycznie, przeprowadzono odpowiednie próby. Poniżej zestawiono najważniejsze wyniki fermentacji ciągłej i periodycznej, przeprowadzonej przy użyciu tego samego szczepu *A. niger*, tej samej pożywki i w takiej samej temperaturze.

Zestawienie to daje pogląd na celowość pracy systemem ciągłym z ewentualnym zastosowaniem wymieniaczy jonów. Dobre rezultaty otrzymane w skali laboratoryjnej wymagają dalszych badań w skali półtechnicznej, które dadzą odpowiedź, czy metoda ciągłej fermentacji cytrynowej nadaje się do wprowadzenia

do przemysłu. Zastosowanie anionitów nie jest warunkiem decydującym, wiązanie kwasu cytrynowego innym sposobem można również stosować z dobrym rezultatem.

	Fermentacja ciągła	Fermentacja periodyczna
Kwasowość ogólna sumaryczna	0,861 n	0,5 — 0,8 n
Cukru w płynie po fermentacji	1,1%	1,0 — 3,0%
Kwasu szczawiowego sumarycznie	0,68%	0,5 — 1,5%
Wydajność kw. cytrynowego w % zużytego cukru	52,8%	35 — 50 %

Powierzchniowa fermentacja cytrynowa znajdzie w ten sposób odpowiednie rozwiązanie technologiczne, dające duże możliwości ułatwienia produkcji kwasu cytrynowego.

ZESTAWIENIE WYNIKÓW

1. Melas odsolony kationitem nie ulega fermentacji cytrynowej wskutek zmniejszenia się ilości kationów w roztworze i obniżenia pH.
2. Na melasie odmineralizowanym za pomocą kationitu i anionitu nawet przy pH = 6 grzybnia się nie rozwija.
3. Melas odsolony w nieznacznym stopniu za pośrednictwem wymieniaczy jonowych, bliskich stanu nasycenia, ma większą zdolność fermentacyjną.
4. Górna warstwa roztworu fermentującego (pod samą grzybnią) posiada najwyższe stężenie kwasu cytrynowego.
5. Ze względu na różnice ciężarów właściwych warstw roztworów wyrównanie stężeń kwasu cytrynowego przy periodycznej fermentacji powierzchniowej zachodzi bardzo wolno, całkowicie dopiero po 24 dobach.
6. Przy ciągłej metodzie fermentacji kwasowość osiąga poziom taki, jak najwyższy uzyskiwany w metodzie periodycznej.
7. Zastosowanie podczas fermentacji wymieniaczy jonowych do wiązania kwasu cytrynowego przyspiesza fermentację i zmniejsza ilości tworzącego się kwasu szczawiowego.
8. W ciągłym procesie fermentacji wstępne zakwaszanie roztworu melasu jest zbędne.
9. Przy ciągłej metodzie grzybnia wykazuje zdolność kwasotwórczą przez dwa miesiące.
10. Starzenie się grzybni powoduje spadek zdolności kwasotwórczej.

C. Zagrodski и B. Krzyształowicz

БЕСПРЕРЫВНАЯ ЛИМОННОКИСЛАЯ ФЕРМЕНТАЦИЯ ПРИ УПОТРЕБЛЕНИИ АНИОНИТА

Резюме

Попытки лимоннокислой ферментации на мелассе, лишенной солей при помощи пермутитов, окончились полной неудачей. Поверхностная непрерывная ферментация, связанная с постоянным удалением из под мицелия лимонной кислоты, ускоряет процесс фер-

ментации и повышает продуктивность. Непрерывная ферментация с употреблением анионита для связывания лимонной кислоты дала возможность сокращения продолжительности ферментации и употребления одного и того мицелия в течение 60 дней. Полученные результаты вполне обосновывают целесообразность метода непрерывной лимоннокислой ферментации.

S. Zagrodzki and *W. Krzysztofik*

THE CONTINUOUS CITRIC FERMENTATION OF MOLASSES WITH APPLICATION OF ANIONIC EXCHANGE AGENTS

Summary

The efforts to produce citric acid from beet molasses, which have been treated previously by passage over anionic exchange materials, resulted in failure.

The surface, continuous fermentation of molasses, connected with the continuous removing of citric acid (Figures 3 and 4) by anionic exchange material, gave greater yields and shortened the time of the process.

It was possible to use for the production the same mycelium during 60 days of continuous fermentation.

The comparison of the yields obtained in surface method and in the suggested in this paper surface, continuous method shows the second to be more economical and efficient.

LITERATURA

1. Bassalik K., 1949: Fermentacje tlenowe wywołane przez pleśnie. *Chemia i Technika* t. **3**, Warszawa.
2. Bernhauer, 1932: Die oxydation Gärungen.
3. Currie J. N., 1917: *J. Biol. Chem.* **31**:15.
4. Januszewicz I., 1949: Fermentacja cytrynowa. *Gaz. Cukrown.* **89**:515.
5. Kovats J., 1947: Możliwości przerobu różnych melasów na kwas cytrynowy na drodze fermentacyjnej, *Gaz. Cukrown.* **87**:142.
6. Kovats J., 1948: Otrzymywanie kwasu cytrynowego na drodze fermentacyjnej. *Przem. Chem.* **4**:360.
7. Kovats J., 1949: Otrzymywanie kwasu cytrynowego z melasu. *Gaz. Cukrown.* **89**:30
8. Loesecke H., 1945: *Chem. and Eng. News*, **23.**
9. Martin S., Waters W., 1952: Production of Citric Acid by Submerged Fermentation. *Ind. Eng. Chem.* **44**:2229.
10. Ost H., Rassow B., 1952: Lehrbuch der Chemischen Technologie, wyd. 24, J. Barth., Lipsk.
11. Prescott S., Dunn C., 1949: Industrial Microbiology, wyd. 2. Mc Graw-Hill, New York.
12. Průmyslova Actiova Společnost 1941: Kaznejov — Brasy F. P. 863, 665.
13. Szybalski W., 1947: Produkcja kwasu cytrynowego z melasu, *Gaz. Cukrown.* **87**:463.
14. Waksman S. A., Karow E., 1946: Pat. U.S., 2, 394, 031.
15. Zagrodzki S., Krzysztofik W., Gortel Z.: Oddzielanie kwasu cytrynowego i szczawiowego za pomocą wymieniaczy jonowych — praca w przygotowaniu.
16. Żurawski G. I. 1950: Wlijanje swobodnoj limonnoj kisłoty na process kisłotoobrazowanja u griba *Aspergillus niger*. *Mikrobiologija* **19**:65.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

E. Kocwa

DZIAŁANIE PENICYLINY I AUREOMYCYNY NA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, *THERMOBACTERIUM CEREALE* I *ACETOBACTER RANCENS*

Z Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej Głównego Instytutu Przemysłu Rolnego i Spożywczego w Krakowie

WSTĘP

W związku z powszechnym zainteresowaniem antybiotykami Zakład Mikrobiologii G. I. P. R. i S. podjął się badań nad bakteriologicznym działaniem tych substancji w zakresie mikrobiologii przemysłowej. Postanowiliśmy śledzić losy mikroorganizmów poddanych działaniu antybiotyków z zamiarem ewentualnego wykorzystania wyników do konserwacji środków spożywczych. Zagadnienie to o szerokim zakresie opracowywaliśmy fragmentami, z których jeden przedstawiony tutaj w krótkim zarysie — zawiera wyniki doświadczeń z przedstawicielami rzech fermentacji: alkoholowej, mlekowej i octowej.

Metodyka badań

Zastosowano dwie metody. Pierwsza metoda (cylinderkowa) określa jakościowo wpływ badanego antybiotyku na dany mikroorganizm, druga (fermentacyjna) natomiast pozwala przebadać go ilościowo. Wzorowano się na cylinderkowej metodzie oznaczania penicyliny (Korzybski i Kuryłowicz), którą odpowiednio zmodyfikowano. Druga metoda — fermentacyjna — była stosowana jako ogólnie przyjęta do badań procesów fermentacyjnych. Dla określenia przebiegu fermentacji alkoholowej opieraliśmy się na codziennych, wagowych pomiarach strat CO_2, potwierdzonych analizami na zawartość kwasów, alkoholu i cukru, przy fermentacji zaś mlekowej i octowej — na oznaczeniach miareczkowych.

Drobnoustroje stosowane do doświadczeń

Saccharomyces cerevisiae rasy „Steinberg", prowadzone w naszym Instytucie od 1947 roku. *Thermobacterium cereale* wyizolowane z zakwasu gorzelniczego w Zakładzie Mikrobiologii S. G. G. W., *Acetobacter rancens* wyizolowany u nas z piwa. Temperatura fermentacji i hodowli agarowej była optymalna dla danego drobnoustroju.

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

Drożdże i penicylina

Tak do metody cylinderkowej, jak i fermentacyjnej stosowano zmodyfikowaną pożywkę syntetyczną Orla - Jensena przy równoczesnym wprowadzeniu 4 dawek penicyliny. Dawki penicyliny przypadające na cylinderki szklane wmontowane w agar przy metodzie jakościowej wynosiły: 2,5 j. — 25 j. — 250 j.— 2500 j.

Do metody fermentacyjnej wprowadzono penicylinę w dawkach: 25 j.—250 j.— 2 500 j. — 25 000 j./150 ml. Wyniki obu metod wykazały, że drożdże nie reagują na obecność penicyliny zahamowaniem wzrostu ani fermentacji.

Drożdże i aureomycyna

W metodzie cylinderkowej stosowano dawki: 0,0017 — 0,017 — 0,17 — 1,7 mg aureomycyny. Zastosowano celowo niskie dawki, ponieważ antybiotyk ten w wyższych dawkach bywa dla człowieka nieco toksyczny. Do metody fermentacyjnej wprowadzono aureomycynę w ilości: 0,1 — 1,0 — 10,0 — 100 mg/150 ml. Nie stwierdzono zahamowania wzrostu i fermentacji przez aureomycynę.

Bakterie kwasu mlekowego i penicylina

Metodą cylinderkową stwierdzono zahamowanie wzrostu *Thermobact. cereale* przez 4 dawki penicyliny: 2,5 j. — 25 j. — 250 j. — 2 500 j.

Metodą fermentacyjną potwierdzono pierwsze wyniki i wykazano zahamowanie fermentacji mlekowej przez 3 dawki penicyliny (10 j. — 100 j. — 1000 j./100 ml) na pożywce Blickfeldta z kredą.

Bakterie kwasu mlekowego i aureomycyna

Badania jakościowe i ilościowe wykazały wrażliwość *Thermobact. cereale* na 4 dawki aureomycyny, jakkolwiek działanie to w porównaniu z wpływem penicyliny było słabsze.

Bakterie kwasu octowego i penicylina

Zarówno metodą cylinderkową, jak i fermentacyjną stwierdzono odporność *Acetobacter rancens* na penicylinę.

Bakterie kwasu octowego i aureomycyna

Metodą jakościową stwierdzono odporność *Acetobacter rancens* na dawki aureomycyny poniżej 2,5 mg i nieznaczne zahamowanie wzrostu przez dawkę 10 mg. Metodą ilościową ustalono również niewrażliwość tego drobnoustroju na dawki do 1 mg/100 ml i lekkie zahamowanie fermentacji począwszy od dawki 10 mg/100 ml.

WNIOSKI Z PRZEPROWADZONYCH DOŚWIADCZEŃ

1. Dwie wprowadzone metody do badań nad działaniem antybiotyków na drobnoustroje przemysłowe są zadowalające dla ścisłego ustalenia ich reakcji na substancje antybiotyczne.
2. Penicylina i aureomycyna nie wpływają na drożdże.
3. Penicylina wybitnie hamuje wzrost laseczek mlekowych.
4. Penicylina nie działa na bakterie octowe.
5. Penicylina nadaje się do sterylizowania płynnych hodowli drożdży, zakażonych laseczkami mlekowymi.
6. Penicyliną można się posługiwać pomocniczo przy izolowaniu drożdży i bakterii octowych z podłoża, w którym rozwinęły się laseczki mlekowe.

E. Kocwa

ВЛИЯНИЕ ПЕНИЦИЛИНА И АУРЕОМИЦИНА НА *SACCHAROMYCES CEREVISIAE, THERMOBACTERIUM CEREALE* И *ACETOBACTER RANCENS*

Резюме

Пенициллин и ауреомицин не оказывали влияния на дрожжи расы „Штейнберг" (167 единиц на 1 мл). Ауреомицин в концентрации 0,1 мг/мл давал слабо стимулирующий эффект.

Рост *Th. cereale* прекратился уже при дозе 0,1 ед./мл. Тормозяще действовал также и ауреомицин. *Acetobacter rancens* проявил устойчивость против пенициллина. Ауреомицин действовал в концентрации 0,1 мг/мл.

E. Kocwa

THE INFLUENCE OF PENICILLIN AND AUREOMYCIN UPON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE, THERMOBACTERIUM CEREALE* AND *ACETOBACTER RANCENS*

Summary

No inhibition of growth and of fermentation in the cultures of yeast („Steinberg") was observed even when concentration of penicillin was as great as 167 units per 1 ml of medium.

Low stimulating effect of aureomycin on yeast was noted in concentration 0,1 mg per 150 ml of medium.

The growth of *Th. cereale* was inhibited by 0,1 units of penicillin per 1 ml. This strain was also susceptible to the influence of aureomycin.

Penicillin was inactive against *A. rancens*. Aureomycin in concentration up from 0,1 mg per 1 ml exerts an inhibiting effect on *Acetobacter*.

J. Kovats i M. Lewicka

BADANIA NAD OCZYSZCZANIEM MELASÓW DLA CELÓW FERMENTACJI KWASU CYTRYNOWEGO

ИССЛЕДОВАНИЯ НАД ОЧИЩЕНИЕМ МЕЛАСС ДЛЯ ЛИМОННО-КИСЛОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ

THE PURIFICATION OF MOLASSES FOR CITRIC ACID FERMENTATION

Fermentacja kwasu cytrynowego jest bardzo wrażliwa na jakość melasów użytych do produkcji.

Normalnie celem polepszenia przebiegu fermentacji melasy należy uprzednio oczyścić.

Autorzy przebadali różne sposoby oczyszczania melasów podane w literaturze oraz w zastrzeżeniach patentowych.

Otrzymane wyniki wskazują na to, że jedynie dwa sposoby oczyszczania melasów, a mianowicie traktowanie węglem aktywnym oraz żelazocjankiem potasu, dają dobre rezultaty.

Przy użyciu roztworów melasów, które zawierają 15% cukru (pH 6,0 do 6,4), wystarczy do tego celu użyć 1,0—1,5% węgla aktywnego względnie 0,4% żelazocjanku potasu i 0,0075—0,01% kwasu fosforowego. Większe dawki kwasu fosforowego działają wybitnie szkodliwie.

Inne sposoby oczyszczania melasów, stosowane w drożdżownictwie wzgl. podane w literaturze, jak np. traktowanie ziemią okrzemkową, węglanem wapnia, wodorotlenkiem wapnia, przedmuchiwanie gorącym powietrzem itp., nie dały dobrych rezultatów.

Niektóre melasy z przyczyn dotychczas niewyjaśnionych nie dają się oczyścić żadnymi środkami i z tego powodu dla celów fermentacji kwasu cytrynowego się nie nadają.

K. Michalska

WPŁYW STREPTOMYCYNY NA WYTWARZANIE KWASU CYTRYNOWEGO PRZEZ *ASPERGILLUS NIGER*

Z Oddziału Biochemii Instytutu Gruźlicy w Warszawie

opublikowano w „Medycynie Doświadczalnej i Mikrobiologii", Vol. V, nr 1, 1953.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

E. Kocwa

DDT JAKO CZYNNIK STYMULUJĄCY FERMENTACJĘ I WZROST DROŻDŻY

Z Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej Głównego Instytutu Przemysłu Rolnego i Spożywczego w Krakowie

WSTĘP

Przy badaniach wpływu różnych substancji chemicznych na drożdże zauważono, że DDT (dwuchlorodwufenylotrójchloroetan) działa wybitnie stymulująco na fermentację alkoholową. Ciekawe to zjawisko stało się przedmiotem dłuższych badań z tego powodu, że związek ten jest powszechnie znany jako trucizna kontaktowa i stosowany jest jako silny środek owadobójczy. Aktywujące działanie na drożdże obserwowano i potwierdzono w wielu doświadczeniach, po których wyniki zebrano i oddano do publikacji. Dalsze badania zmierzają do wykorzystania tych spostrzeżeń dla celów praktycznych.

METODYKA BADAŃ

Określenie przebiegu fermentacji przeprowadzono opierając się na stratach CO_2 przez codzienne ważenie nastawów fermentacyjnych i potwierdzając wyniki analizami na zawartość kwasów, alkoholu i cukru po fermentacji. Fermentację prowadzono na drożdżach winiarskich rasy „Steinberg" na zmodyfikowanej pożywce syntetycznej według Orla-Jensena.

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

Ciekawsze wyniki 20 przeprowadzonych doświadczeń podano niżej:

W doświadczeniu pierwszym zauważono pobudzające działanie na fermentację 10% preparatu DDT przy zastosowaniu dawek: 0,1 g i 1 g/150 ml pożywki (dawka rzeczywista 100% DDT wynosi 0,01 g i 0,1 g). Po 6 dniach fermentacji uzyskano więcej alkoholu w obecności DDT niż w nastawach kontrolnych po 42 dniach.

Do drugiego doświadczenia zastosowano preparat zagraniczny wysokiej czystości o p.t. 103°. Preparat dodawano w 4 dawkach: 0 0001 g; — 0,001 g; — 0,01 g; — 0,10 g/150 ml pożywki. Stwierdzono, że preparat ten działa stymulująco począwszy od dawki 1 mg/150 ml, przy czym działanie to potęguje się w mia-

rę wzrostu dawki. Po upływie 2 dni fermentacji straty CO_2 z nastawów zawierających najwyższą dawkę DDT były o 100% większe niż ubytek tego gazu z nastawów kontrolnych. Stan ten utrzymywał się jeszcze przez 4 następne dni. W miarę wzrostu zawartości alkoholu działanie stymulujące DDT słabło. Analizy wykonane po 8 dniach fermentacji w obecności tego związku wykazały o około 6% alkoholu więcej aniżeli w kontroli.

Próba trzecia i czwarta wykazały również stymulujące działanie preparatu krajowego (Azotoks, p.t. 76°). Stwierdzono jednak także i pewne różnice w porównaniu z DDT pochodzenia zagranicznego. Różnice te polegały na tym, że niższe dawki azotoksu, do 0,1 g/150 ml, w przeciwieństwie do takich samych dawek preparatu zagranicznego nie działały stymulująco, natomiast dawki wyższe, 0,1 — 0,15 — 0,20 — 0,75 g/150 ml, wywierały wyraźny wpływ pobudzający. Ponadto dawka 0,75 g azotoksu na 150 ml wykazała działanie silniejsze niż ta sama dawka DDT zagranicznego.

W próbie piątej wprowadzono do pożywki czysty DDT o p.t. 110° (p,p' izomer dwuchlorodwufenylotrójchloroetanu), spośród istniejących izomerów wykazujący największą aktywność owadobójczą. Obecność innych izomerów występujących jako zanieczyszczenia wpływa na obniżenie punktu topnienia. Czysty izomer otrzymano u nas z technicznego preparatu przez krystalizację z 96% alkoholu i wykazano silniejsze jego działanie stymulujące na fermentację niż preparatu DDT o p.t. 80° i 96°.

W następnym doświadczeniu wprowadzono DDT w rozpuszczalniku. Do nastawów dodano alkoholowy roztwór DDT o p. t. 103° w dawkach: 0,0001 — 0,001 — 0,01 g 150 ml pożywki. Jakkolwiek związek ten dodany poprzednio *in substantia* spowodował 100% przyrost alkoholu w pierwszych dniach fermentacji, dodany jako roztwór alkoholowy zachował się prawie obojętnie wobec drożdży i stymulował fermentację bardzo słabo.

W doświadczeniu siódmym wykazano ujemny wpływ temperatury sterylizacji pożywki (120°) na aktywność preparatu (azotoks).

W doświadczeniu ósmym obserwowano aktywność DDT w zależności od stadium fermentacji. W tym celu przeprowadzono trzy próby porównawcze. Obok nastawów kontrolnych przygotowano nastawy z preparatem DDT, dodanym równocześnie z zaszczepianiem pożywki drożdżami, oraz takie, do których po upływie 3 dni dodano preparat. Wyniki tych badań wykazały, że DDT działa stymulująco w wypadku zastosowania go w czasie szczepienia drożdżami. Dodany natomiast w stadium burzliwej fermentacji, gdy pożywka zawiera już rozmnożone drożdże i około 6% alkoholu, nie wykazuje stymulacji. Z doświadczeń tych można by przypuszczać, że DDT powoduje szybsze mnożenie się drożdży.

W doświadczeniu dziewiątym starano się zbadać, czy ta sama dawka preparatu, użyta powtórnie po zmianie pożywki, będzie jeszcze wywierała działanie pobudzające. Zastosowano cztery dawki azotoksu i preparatu zagranicznego DDT w ten sposób, że po 8 dniach zdekantowano przefermentowany płyn i do pozostałego osadu drożdży i preparatu (preparat jest nierozpuszczalny) dolano nową pożywkę. Czynność tę powtarzano czterokrotnie, tak że przeprowadzono 4 ośmiodobowe fermentacje na tych samych drożdżach i tych samych dawkach DDT. Okazało się, że stymulacja jest zjawiskiem powtarzającym się stale i preparat użyty wielokrotnie wywiera taki sam wpływ. Można by zatem przypuszczać, że alkohol jest czynnikiem znoszącym stymulację DDT, albo też, że drożdże w obecności etanolu nie mogą korzystać z preparatu.

W dalszych próbach ustalono wpływ wysokich dawek. Dodano DDT (p. t. 96°) w ilości: 0,01; 0,10; 0,50; 1; 2; 3; 4; 5; 6 g/100 ml pożywki. Mimo bardzo wysokich dawek preparat działał nadal tylko stymulująco. Przypuszczalnie drożdże wykorzystują preparat tylko częściowo, a jego nadmiar nie wywiera szkodliwego na nie wpływu. Być może wykorzystywana przez te drobnoustroje jest tylko taka ilość preparatu, która może się rozpuścić w lipidach komórek. Wg danych z literatury DDT działa tym silniej owadobójczo, im subtelniej jest rozdrobniony. W badaniach nad drożdżami nie otrzymano tego efektu.

Dalsze próby zmierzały do wykrycia DDT w winie otrzymanym przez fermentację pożywki syntetycznej z dodatkiem tego preparatu. Wino nie zawierało wykrywalnych śladów DDT.

W doświadczeniu piętnastym przystąpiono do statystycznego określenia ilości komórek drożdżowych w próbach kontrolnych i zawierających preparat DDT o p. t. 96° i DDT o p. t. 110°. Liczenie komórek w komorze Thoma wykazało silny wpływ tego związku na rozmnażanie drożdży. Nastawy z dodatkiem preparatu o p. t. 96° w dawce 0,1 g/100 ml miały o 36,6% komórek więcej niż kontrolne, a nastawy o tej samej dawce preparatu o p. t. 110° — o 56,6%.

Kilka następnych doświadczeń przeprowadzono na produktach wyjściowych do syntezy DDT (chloral i chlorobenzen). Chlorobenzen hamował fermentację zupełnie, chloral tylko częściowo. Oba związki dodane łącznie hamowały początkowo fermentację, po 4 dniach jednak drożdże zaczęły fermentować.

Ostatnie doświadczenie przeprowadzono z gameksanem i stwierdzono działanie pobudzające również i tego preparatu.

WNIOSKI Z PRZEPROWADZONYCH DOŚWIADCZEŃ

DDT działa stymulująco na fermentację i wzrost drożdży. Stosując go przy fermentacji można osiągnąć wyższą zawartość alkoholu w wielokrotnie krótszym czasie. Po opracowaniu opisanych spostrzeżeń w szerszym zakresie można by szukać sposobu wykorzystania ich dla celów praktycznych. Jak wstępne doświadczenia wykazały, DDT wpływa również stymulująco na niektóre inne drobnoustroje przemysłowe, co można by wykorzystać w celu bądź podwyższenia wydajności fermentacji, bądź otrzymywania większej masy drobnoustrojów. Badanie to można by rozszerzyć na drobnoustroje chorobotwórcze i w razie wykazania wpływu DDT na mnożenie się bakterii wykorzystać do otrzymywania hodowli w krótszym czasie np. w produkcji szczepionek.

Samo zagadnienie może budzić zainteresowanie z punktu widzenia teoretyczno-naukowego przez zwrócenie uwagi na budowę chemiczną DDT, wykazującą własności czynnika wzrostowego. Wyniki pracy mogą być przyczynkiem do metod wykrywania DDT na drodze biologicznej.

E. Коцва

ВЛИЯНИЕ Д.Д.Т. НА РОСТ И ФЕРМЕНТАЦИЮ ДРОЖЖЕЙ

Резюме

Д.Д.Т. стимулирует рост *S. cerevisiae* и повышает интенсивность ферментации уже в концентрации 1 мг/150 мл среды. Содержание спирта в среде содержащей Д.Д.Т. было уже спустя 6 дней так велико, как на контрольной среде после 42 дней. Стимулирующиее действие Д.Д.Т. в некоторой степени пропорционально к его концентрации. Стимуляция наблюдается только в первой фазе роста, когда еще не произошло нагромождение спирта в большом количестве. Подобное действие вызывал также „азотокс" и „гамексан".

Исходные для синтеза Д.Д.Т. продукты, хлорал и хлоробензол, тормозили рост и ферментацию. Спиртовые растворы Д.Д.Т. не оказывали никакого влияния.

E. Kocwa

DDT AS A STIMULANT OF GROWTH AND FERMENTATION IN YEASTS

Summary

Dichlordiphenyltrichlorethane (DDT), when added to a synthetic medium, accelerated alcoholic fermentation. The yield of ethanol in presence of DDT after 6 days of fermentation was 100% higher than in control fermentation-tests after 42-days. The Polish preparation of DDT called „Azotox" showed similar properties. Hexachlorcyclohexan also stimulated the fermentation. Chloral did not stimulate fermentation; chlorbenzen inhibited it. The DDT stimulated growth and multiplication of yeast.

A. Urbańska-Nowakowska

WPŁYW DROŻDŻY BROWARNICZYCH I KIEŁKÓW SŁODOWYCH NA FERMENTACJĘ MLEKOWĄ MELASU

Z Zakładu Fizjologii Roślin i Mikrobiologii UŁ w Łodzi

Bakterie fermentacji mlekowej oprócz cukru, azotu w postaci białek lub produktów niecałkowicie posuniętej ich hydrolizy wymagają obecności w podłożu czynników wzrostowych. Wg Orla-Jensena (1943) silne działanie wywiera mieszanina kwasu nikotynowego i różnych kwasów nukleinowych. Zagadnienie stworzenia odpowiedniego podłoża dla bakterii mlekowych ma doniosłe znaczenie przy produkcji kwasu mlekowego na skalę przemysłową, szczególnie gdy przerabianym surowcem są roztwory cukru buraczanego lub melasu. Przy fermentacji tych surowców konieczny jest dodatek wzbogacający środowisko w związki odżywcze i witaminy. Najszersze zastosowanie mają tutaj kiełki słodowe, które dodaje się w ilości 1—2% w stosunku do objętości zacieru. Od niedawna jednak (1950) w miejsce kiełków używa się autolizatu drożdżowego, po raz pierwszy w Polsce zastosowanego w fabryce kwasu mlekowego w Ł. Przy zastosowaniu autolizatu osiągnięto znaczne skrócenie okresu fermentacji i pewne obniżenie kosztów przerobu. Praca ta, której tematem było zbadanie wpływu autolizatu drożdżowego i wyciągu kiełków słodowych, potwierdziła te wyniki.

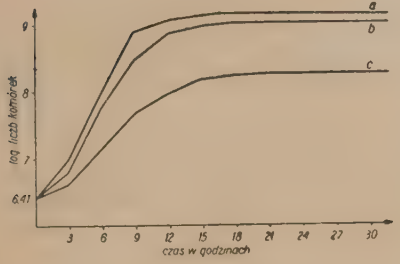
BADANIA WŁASNE

Fermentacji poddawane były roztwory melasu zawierające 13% sacharozy, odpowiednią ilość węglanu wapnia i w jednym wypadku 2% autolizatu drożdżowego, a w drugim 2% wyciągu kiełków słodowych, przy użyciu *Thermobacterium Delbrücki* wyodrębnionego z fabryki kwasu mlekowego w B. Autolizat drożdżowy z przemytych odpadkowych drożdży browarniczych sporządzono w temp. 51,5° w ciągu 48 godzin. Zawierał on 3,12% azotu określonego metodą mikro-Kjeldahla. Wyciąg kiełków słodowych, otrzymany przez gotowanie w autoklawie namoczonych kiełków, zawierał 2,79% N.

W I serii doświadczeń fermentacje trwały tylko 48 godzin i służyły do oznaczenia ilości komórek i przyrostów kwasu mlekowego w odstępach 3-godzinnych. Liczbę komórek obliczano bezpośrednio w komorze Thoma, przyrost ilości kwasu mlekowego oznaczano metodą aldehydową (Bömer, Juckenack i Tillmans, 1933). W celu sprawdzenia, czy sam melas zawierający 1,78% N jest dostatecznym podłożem dla bakterii, poddawano fermentacji roztwory melasu z węglanem wapnia bez żadnych innych dodatków.

W II serii doświadczeń fermentacje trwały kilka dni. Określano przy tym czas fermentacji i dobowe przyrosty ilości kwasu mlekowego. Fermentacje prowadzono w temp. 51,5 w kolbie Bömera, w której zanurzone było szklane mieszadełko połączone z motorkiem elektrycznym.

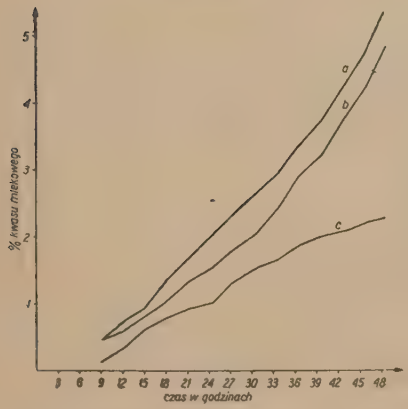
Wyniki fermentacji przedstawione są w niżej zamieszczonych wykresach:



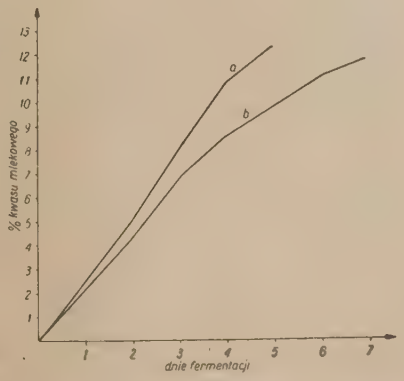
Rys. 1. Przyrost ilości komórek *Th. Delbrücki*
a — na melasie z autolizatem drożdżowym
b — na melasie z wyciągiem kiełków słodowych
c — na melasie samym
Wyniki jednego, typowego doświadczenia.

Рис. 1. Прирост количества клеток *Th. Delbrücki*
а) на мелассе с автолизатом дрожжей,
б) на мелассе с экстрактом из солодовых ростков
в) на мелассе

Fig. 1. The increase in the cells-number of *Th. Delbrücki*
a — in molasses with yeast autolysate
b — in molasses with malt extract
c — in molasses



Rys. 2. Wzrost ilości kwasu mlekowego w podłożu (oznaczenia jak na rys. 1)
Wyniki jednego, typowego doświadczenia.
Рис. 2. Увеличение количества молочной кислоты в среде. Обозначения, как на рис. 1
Fig. 2. Production of lactic acid by *Th. Delbrücki*
For explanation see Fig. 1



Rys. 3. Wzrost ilości kwasu mlekowego w podłożu (oznaczenia jak na rys. 1)
Średnie wyniki z czterech doświadczeń.
Рис. 3. Увеличение количества молочной кислоты в среде. Обозначения, как на рис. 1.
Fig. 3. Production of lactic acid by *Th. Delbrücki*
For explanation see Fig. 1

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że na podłożu z dodatkiem autolizatu drożdżowego otrzymano:

1) największy plon komórek (po 18 godz. 16.10^8 w 1 ml zacieru),
2) największe przyrosty dobowe ilości kwasu mlekowego (przeciętnie 2,5%),
3) skrócenie czasu fermentacji w porównaniu z fermentacją zacieru zawierającego kiełki słodowe o 2 dni (28,6%),
4) dużą wydajność kwasu mlekowego obliczoną w stosunku do sacharozy, wynoszącą przeciętnie 94% po 5 dniach fermentacji.

Natomiast na podłożu z dodatkiem wyciągu kiełków słodowych otrzymano:
1) po 18 godz. 12.10^8 komórek w 1 ml zacieru,
2) przyrosty dobowe ilości kwasu mlekowego przeciętnie — 1,53%,
3) czas fermentacji wynoszący 7 dni,
4) wydajność kwasu mlekowego przeciętnie 90% po 7 dniach fermentacji.

Roztwór melasu zawierający tylko węglan wapnia okazał się podłożem zbyt ubogim dla dobrego rozwoju bakterii. Po 24 godzinach w 1 ml zacieru było tylko 22.10^7 komórek, a przyrosty ilości kwasu mlekowego (2,2% po 48 godz.) były również odpowiednio mniejsze.

Z doświadczeń tych wynika, że autolizat drożdżowy wywiera aktywujące działanie na *Th. Delbrücki* przystosowane do melasu.

Ma to swoje uzasadnienie w składzie chemicznym drożdży, które oprócz łatwo przyswajalnych związków azotowych (po autolizie) zawierają riboflawinę, tiaminę, kwas nikotynowy, pantotenowy oraz różne kwasy nukleinowe (Karczewska, 1948).

Opierając się na wynikach tej pracy należy sądzić, że autolizat drożdżowy może mieć zastosowanie przy produkcji kwasu mlekowego na skalę przemysłową jako dobry surowiec pomocniczy, lepszy niż dotychczas stosowane kiełki słodowe.

Autolizat drożdżowy oprócz aktywującego działania na *Th. Delbrücki* ma jeszcze tę zaletę w porównaniu z kiełkami, że pod względem mikrobiologicznym jest produktem bardzo czystym. Kiełki natomiast zawierają bogatą mikroflorę przetrwalnikującą, wskutek czego są często źródłem zaburzeń w czasie fermentacji.

А. Урбанска-Новаковска

ВЛИЯНИЕ ДРОЖЖЕЙ И СОЛОДОВЫХ РОСТКОВ НА МОЛОЧНО-КИСЛУЮ ФЕРМЕНТАЦИЮ МЕЛАССЫ

Резюме

Прибавление к среде автолизата дрожжей повышает урожай *Thermobacterium Delbrücki* (рис. 1) и количество образованной молочной кислоты (рис. 2 и 3). Прибавление солодовых ростков оказывает меньшее влияние.

A. Urbańska-Nowakowska

THE INFLUENCE OF BREWERS YEAST AND OF MALT UPON THE LACTIC ACID FERMENTATION OF MOLASSES

Summary

Addition of yeast autolysate to fermenting substrat stimulated the growth and lactic acid production by *Thermobacterium Delbrücki* (Fig. 1, 2 and 3).

The malt was less effective in this respect. According to the author the stimulating effect of yeast autolysate in due to its high contents of vitamins.

LITERATURA

1. Bömer A., Juckenack A., Tillmans J., 1933: Handbuch der Lebensmittelchemie. Springer-Verlag, Berlin.
2. Karczewska H., 1948: Drożdże jako źródło białka i witamin. *Przemysł Rolny* nr 9—10, 222.
3. Orla-Jensen, 1943: The Lactic Acid Bacteria. Kopenhaga.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

F. Nowotny i *W. Rzędowski*

BADANIA NAD OTRZYMYWANIEM ENZYMATYCZNYCH PREPARATÓW DO KLAROWANIA SOKÓW OWOCOWYCH I WIN

Z Zakładu Przemysłu Winiarskiego Głównego Instytutu Przemysłu Rolnego i Spożywczego w Krakowie

Soki owocowe otrzymane z tłoczni są mętne i przed dalszą przeróbką na płynny owoc zwykle się je klaruje. Metod klarowania soków znamy wiele, np. klarowanie żelatyną względnie żelatyną i taniną. Inną metodą klarowania, którą stosuje się na coraz większą skalę, jest klarowanie za pomocą preparatów enzymatycznych. Polega ono na enzymatycznej hydrolizie substancji pektynowych, będących główną przyczyną zmętnienia soków. Metoda ta osiągnęła przewagę nad innymi ze względu na: 1) szybkość i niezawodność działania, 2) lepszy efekt klarowania, 3) większą wydajność filtrów. Do produkcji preparatów enzymatycznych wykorzystano własności wytwarzania przez niektóre pleśnie, zwłaszcza z rodzaju *Aspergillus*, pewnych ilości enzymów pektynowych.

Enzymatyczne klarowanie soków zapoczątkował Takamine, ale dopiero prace Kertesza i Mehlitza doprowadziły do produkcji preparatów enzymatycznych na skalę przemysłową. Najbardziej znanymi i najczęściej stosowanymi w przemyśle preparatami są Pectinol i Filtragol. Metody produkcji tych preparatów są strzeżone przez patenty i nie zostały opublikowane. Opisy produkcji spotykane w literaturze są skąpe i niewystarczające.

Celem niniejszej pracy było więc opracowanie własnej metody produkcji preparatów enzymatycznych do klarowania soków owocowych. Chodziło bowiem to, żeby uniezależnić nasz przemysł od importu tego preparatu.

Najważniejszymi zagadnieniami przy opracowywaniu niniejszego tematu były następujące: wytypowanie pleśni wytwarzających w czasie hodowli maksymalną ilość enzymów pektynowych, wyszukanie najodpowiedniejszej pożywki do hodowli, ustalenie optymalnego czasu hodowli, stwierdzenie działalności enzymów pektynowych w obecności alkoholu, usunięcie zapachu grzybni z preparatów itp.

Badania te prowadzono zarówno na pożywkach płynnych, jak i stałych. Po upływie określonego czasu wyrosłą grzybnię wraz z podłożem suszono w próżni (temp. 40°) i następnie rozdrabniano. Aktywność enzymów pektynowych w preparatach badano przez określenie zmian lepkości 0,5% roztworu pektyny, jak również przez pomiar czasu potrzebnego do sklarowania soków jabłkowych.

Spośród wymienionych problemów specjalną uwagę zwrócono na przebadanie wpływu składników pożywki, a w tym głównie węglowodanowych i azotowych, na ilość wytwarzanych przez pleśń enzymów pektynowych. W wyniku szeregu doświadczeń stwierdzono olbrzymi wpływ rodzaju pożywki na wielkość siły pektolitycznej preparatów. Okazało się, że wytwarzanie enzymów pektynowych przez *A. niger* uzależnione jest w olbrzymiej mierze od obecności w pożywce substancji

pektynowych. Preparaty otrzymane z hodowli na pożywkach zawierających glukozę wykazywały minimalną aktywność enzymów pektynowych, natomiast preparaty z hodowli na pożywkach zawierających pektynę wykazywały znaczną aktywność enzymatyczną. Okazało się także, że poza źródłem węgla również i źródło pożywienia azotowego ma duże znaczenie dla tworzenia enzymów pektynowych przez *A. niger*.

Stwierdzono dalej, że przystosowanie *A. niger* do pożywki zawierającej pektynę — przez parokrotne przeszczepianie go na podłoże bogate w ten składnik — daje dobre rezultaty, to znaczy, że *A. niger*, przyzwyczajając się do środowiska, wytwarza coraz więcej enzymów pektynowych.

Do prób nad wytypowaniem najodpowiedniejszej pożywki stałej użyto: otrąb pszennych, jęczmiennych, żytnich, młóta, wysłodków buraczanych, wytłoków jabłkowych i marchwi. Stosowano te substancje jako pożywki bądź to bez żadnych dodatków, bądź też z dodatkami substancji azotowych i pektynowych. Wykonywano również próby z pożywkami mieszanymi. Najlepsze wyniki osiągnięto przy zastosowaniu do hodowli wysłodków buraczanych. Inne substancje dawały preparaty o znacznie mniejszej sile pektolitycznej.

Szukając pleśni, która wytwarzałaby największą ilość enzymów pektynowych, stwierdzono, że w warunkach wyrównanych dla wszystkich pleśni użytych do badań na pierwsze miejsce wysuwa się *A. niger*. Inne pleśnie układają się pod tym względem w następującej kolejności: *A. fumigatus*, *A. wentii*, *A. oryzae* i *A. flavus*. Należy podkreślić, że pleśnie te wytwarzają znacznie mniej enzymów pektynowych niż *A. niger*.

W doświadczeniu nad ustaleniem optymalnego czasu hodowli stwierdzono, że *A. niger* wytwarza maksymalną ilość enzymów pektynowych już po 2—4 dniach hodowli. W miarę przedłużania czasu hodowli ilość enzymów w preparatach zaczyna spadać. Jako optymalną temperaturę ustalono 30—35°.

Otrzymane preparaty miały zapach i smak grzybni, które to cechy w pewne ilości przechodziły do klarowanego soku. Opracowany sposób usuwania tego zapachu polega na ogrzewaniu suchych preparatów enzymatycznych (zawartość wody około 10%) w temperaturze 100—110° przez 15—30 minut. Można też usunąć zapach grzybni przez dodanie do preparatu 0,5—1% węgla aktywowanego. Dobre rezultaty daje także stosowanie obu tych kombinacji równocześnie — przy zastosowaniu krótszego czasu ogrzewania preparatów i mniejszej dawki węgla aktywowanego.

Najlepsze z uzyskanych przez nas preparaty klarowały soki jabłkowe przy dawce preparatu 1 g/l w temperaturze 18° w czasie 1—1,5 godz. Dla porównania należy podać, że preparaty zagraniczne, jak Filtragol czy Pectinol, wg danych z literatury klarują soki w tych samych warunkach i przy zastosowaniu tych samych dawek po upływie 10—14 godzin.

Wykonano także próby nad zastosowaniem takich preparatów do klarowania win. Najpierw przebadano wrażliwość enzymów pektynowych na alkohol etylowy. W tym celu określano zmiany lepkości roztworu pektyny pod wpływem preparatów enzymatycznych w obecności alkoholu (od 0,5—18%). W wyniku tych doświadczeń stwierdzono, że alkohol etylowy tylko nieznacznie wpływa na wielkość siły pektolitycznej. Próby zaś klarowania win mętnych naszymi preparatami wykazały, że tylko niektóre z nich ulegały sklarowaniu pod wpływem naszych preparatów enzymatycznych. Fakt ten wiąże się ściśle z rodzajem substancji koloidalnych wywołujących zmętnienie wina.

Opracowano sposoby ekstrakcji enzymów pektynowych z surowych preparatów i przenoszenie ich na inny obojętny substrat. Próby te wykonano nie tylko w celu usunięcia smaku i zapachu grzybni, ale przede wszystkim w celu otrzymania preparatów enzymatycznych o dużej sile klarującej. Uzyskany ekstrakt wodny można albo w warunkach zachowawczych podgęszczać, albo wytrącać z niego (np. alkoholem) enzymy pektynowe i przenosić na obojętny substrat.

Na koniec wykonano próbę półtechniczną, która całkowicie potwierdziła wyniki laboratoryjne.

Na zakończenie trzeba podkreślić, że powyższy referat ze względu na szczupłość miejsca nie obejmuje wszystkich przeprowadzonych badań. Całość pracy będzie niebawem opublikowana i zainteresowani znajdą w niej odpowiedź na wiele spraw tutaj pominiętych lub też opisanych w wielkim skrócie.

Ф. Новотны и В. Ржендовски

ПРОБЫ ПОЛУЧАНИЯ ЭНЗИМАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРОСВЕТЛЕНИЯ ПЛОДОВЫХ СОКОВ И ВИН

Резюме

Больше всего пектиновых энзимов продуцирует *Aspergillus niger*, меньше *A. fumigatus A. wentii, A. oryzae, A. flavus.*

Энзим образуется в изобилии на средах, содержащих пектины и соответственный источник азота.

Практически самым лучшим субстратом оказалась среда из свеклосахарных выжимок. Наиболее интенсивно протекает процесс образования энзимов в течение первых 2—4 дней культивирования при температуре 30—35°.

Полученные энзиматические препараты в дозах 1 г/л просветляли яблочные соки при температуре 18° в течении 1—1,5 часа.

Препарат пригоден также для просветляния вин.

Пригодность препаратов была проверена в полутехническом масштабе.

F. Nowotny and *W. Rzędowski*

PREPARATION OF THE PECTIN ENZYME COMPLEX FOR CLARIFICATION OF FRUIT JUICES

Summary

The greatest amount of pectin enzyme was produced by *Aspergillus niger*; *A. fumigatus*, *A. wentii*, *A. oryzae* and *A. flavus* were in this respect less active.

The secretion of the enzyme was most vigorous on substrats containing pectin and a suitable source of nitrogen.

For practical purposes sugar beet residuum was found to be a suitable substratum. The greatest amount of the enzyme was produced after 2—4 days of incubation at 30—35°.

Obtained by this method enzyme preparations was highly active.

The clarification of the apple-juice was complete during 1—1 1/2 hours action of the enzyme in the dosis 1 g per liter of juice at 18°.

This preparation was also suitable for clarification of wines.

The method of enzyme production was worked out on the half-technical scale.

Z. Kin

FERMENTACJA ETANOLOWA ŁUGÓW POSIARCZYNOWYCH

СПИРТОВАЯ ФЕРМЕНТАЦИЯ СУЛЬФИТНЫХ ЩЕЛОКОВ

ALCOHOLIC FERMENTATION IN SULPHITE LIQUORS

Ługi pocelulozowe siarczynowe z metody wapniowej zawierają głównie ligninosulfonian wapniowy, węglowodany, sole mineralne (siarczyn i siarczan wapniowy), wolny SO_2, kwasy lotne (mrówkowy, octowy) i metanol.

Węglowodany są częściowo związane z ligninosulfonianem wapniowym. Zawartość wyżej wymienionych substancji jest zależna od warunków roztwarzania i rodzaju drewna (z drzew iglastych bądź liściastych).

W przypadku roztwarzania drewna świerkowego zawartość węglowodanów wynosi ok. 20% suchej substancji ługów.

Przeciętna zawartość cukru ogólnego (drewno świerkowe) wynosi 3,22 g/100 ml. Wg naszych badań skład tego cukru jest następujący:

Mannoza	1,50 g/100 ml
Glukoza	0,53 „
Galaktoza	0,37 „
Ksyloza i arabinoza	0,82 „
	3,22 g/100 ml

Zawartość tych węglowodanów predystynuje ługi posiarczynowe jako suroe wiec do fermentacji na alkohol etylowy, kwas mlekowy, cytrynowy, butanol, paszbiałkowe (w postaci drożdży lub pleśni). Fermentację ługów na alkohol po uprzedniej neutralizacji przeprowadza się za pomocą drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Wielka sterylność brzeczek ługowych pozwala pracować metodą ciągłą, zwrotną separacją drożdży.

Parametry: pH 4,5 — 5, temp. 34°, czas 24 — 30 godz.,
ilość komórek drożdż. 100 — 150.10^6/ml.

Zawartość alkoholu w brzeczce około 1% wag. wymaga specjalnej konstrukcji aparatów destylacyjnych i zużywa dużą ilość pary. Nowoczesne rozwiązania aparaturowe i powiązania oddziału spirytusowego z fabryką celulozy pozwalają na racjonalną gospodarkę cieplną. Wydajność alkoholu etylowego z 1 m^3 ługu wynosi około 10 — 12 l.

L. Galińska, F. Goździk

WPŁYW KWASU OCTOWEGO NA FERMENTACJĘ ALKOHOLOWĄ

(Streszczenia nie nadesłano)

K. Orlowska

BADANIE BAKTERII OCTOWYCH WYSTĘPUJĄCYCH W OCTOWNIACH POLSKICH

ИССЛЕДОВАНИЯ НАД УКСУСНОКИСЛЫМИ БАКТЕРИЯМИ, ВЫСТУПАЮЩИМИ НА ПОЛЬСКИХ УКСУСНЫХ ЗАВОДАХ

THE STUDIES ON THE ACETIC ACID BACTERIA IN POLISH VINEGAR FACTORIES

Z Zakładu Fizjologii Roślin i Mikrobiologii U W

W wyniku przeprowadzonej izolacji wyodrębniono z sześciu octowni polskich (w Warszawie, Łodzi, Poznaniu, Raciborzu, Szopienicach i w Kielcach) 9 szczepów bakterii octowych: *Acetobacter industrium*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter ascendens* (*a*) i (*b*), *Acetobacter acetosum*, *Acetobacter suboxydans*, *Acetobacter capsulatum* i *Acetobacter acetigenum*.

Wśród nich najczęściej spotykanymi były: *Acetobacter ascendens*(*b*), *Acetobacter industrium*, *Acetobacter acetosum* i *Acetobacter rancens*, z których każdy występował w dwóch lub trzech octowniach.

W wyniku przeprowadzonych badań fizjologicznych i morfologicznych można było wyprowadzić następujące wnioski:

a) *A. ascendens* (typ *a*) stanowi odmianę *A. ascendens*, ogólnie przyjętego w literaturze.

b) Wszystkie octownie, z których pobierano materiał, pracują na szczepach zanieczyszczonych przez gatunki „dzikich" i nieproduktywnych bakterii, przy czym występujące w nich gatunki bakterii różnią się między sobą wymaganiami w stosunku do związków azotowych, temperatury, granicy tolerowanej koncentracji etanolu i kwasu octowego itd., co utrudnia bardzo uzyskanie wysokiej i równomiernej produkcji octu.

c) Stwierdzana przez wielu autorów zmienność bakterii octowych, a szczególnie *A. acetosum* i *A. ascendens*, pod wpływem warunków hodowli sztucznej, jak i niejednokrotnie zacieranie się wyraźnych granic między poszczególnymi gatunkami, znalazły potwierdzenie również w niniejszej pracy.

A. Jankun

BADANIA NAD DROŻDŻAMI WYSTĘPUJĄCYMI NA OWOCACH KRAJOWYCH

Z Działu Mikrobiologii G.I.P.R. i Spoż. w Krakowie

Opublikowano w *Acta Microbiologica Polonica*, Vol. II, nr 1, 1953.

S. Lenard

WPŁYW SIARKOWANIA NA MIKROFLORĘ MOSZCZÓW OWOCOWYCH

(Streszczenia nie nadesłano)

H. Rzędowska

ZAGADNIENIE WTÓRNEJ FERMENTACJI ZIARNA KAKAOWEGO W ŚWIETLE BADAŃ WŁASNYCH

Z Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej Głównego Instytutu Przemysłu Rolnego i Spożywczego w Krakowie

Badania nad „wtórną fermentacją" ziarna kakaowego miały na celu polepszenie jakości ziarna przeznaczonego do przerobu na czekoladę. Zagadnienie powyższe wymagało, poza znalezieniem najlepszej metody korygowania wad smakowych ziarna kakaowego, również przebadania samej istoty „wtórnej fermentacji".

Przemysł cukierniczy używa nasion *Theobroma Cacao* do wyrobu czekolad i proszku kakaowego. Surowe ziarno kakaowe poddane zostaje w krajach macierzystych procesowi fermentacji pierwotnej w celu uwolnienia pojedynczych ziaren od miąższu owocowego oraz uzyskania odpowiedniej barwy, aromatu i smaku ziarna. W czasie tego procesu zachodzi fermentacja mikrobiologiczna miąższu owocowego oraz równolegle z nią przebiegają wewnątrz ziarna kakaowego procesy enzymatyczne przy udziale tlenu powietrza. Wewnętrznym tym procesom towarzyszą zmiany barwy liścieni z bladożółtej do brunatnoczerwonej i czekoladowej. Jednocześnie ziarno zatraca smak gorzki i cierpki, a uzyskuje miły aromat. W dużej mierze zmiany te wywołane są przemianami substancji garbnikowych. Bardzo duży wpływ na jakość ziarna kakaowego, przeznaczonego do dalszego przerobu, ma wyżej wspomniana, racjonalnie przeprowadzona fermentacja pierwotna.

Ponieważ jednak ziarno kakaowe jest bardzo często wadliwie przefermentowane lub niedofermentowane, zalecane jest poprawienie wad popełnionych przy fermentacji pierwotnej za pomocą tzw. „fermentacji wtórnej".

Fincke (1936) odnosi się krytycznie do tej nazwy, gdyż uważa, że proces ten nie został w dostatecznym stopniu przebadany, aby można go było uznać za rzeczywistą wtórną fermentację. Wielu autorów przypisuje zmiany organoleptyczne i zmiany barwy liścieni — wtórnym procesom enzymatycznym. Dambl on (1940) twierdzi, że korzystne zmiany barwy ziarna osiąga się przy zastosowaniu drożdży w temperaturze 40—50° w ciągu 72 godzin. Rapoport (1951) podaje, że już w czasie fermentacji pierwotnej i następnie pod wpływem suszenia ziarna zostają w nim zniszczone enzymy i nie mogą tym samym wywoływać ponownie dalszych wtórnych przemian w ziarnie kakaowym. Widzimy więc, że zdania odnośnie istoty wtórnej fermentacji ziarna kakaowego są podzielone i różnorodne.

Już przed 100 laty wprowadzono korygowanie wad smakowych ziarna kakaowego na skalę fabryczną przez zastosowanie moczenia i suszenia go bezpośrednio przed przerobem. Zaobserwowano bowiem, że na skutek tego procesu łuska łatwiej odchodzi od liścieni i polepsza się smak ziarna kakaowego. Działaniem wody i powietrza tłumaczono zachodzące wtedy reakcje chemiczne i biochemiczne w temperaturze poniżej 65°.

Fincke (1936) wspomina, że podobne zmiany barwy i aromatu ziarna kakaowego osiąga się przez traktowanie go wodą z dodatkiem potażu, przy równoczesnym przewietrzaniu świeżym

powietrzem. Damblon zaleca zwilżanie ziarna kakaowego wodą (30% w stosunku do masy ziarna) przez 48 godzin w temperaturze 40° i suszenie go w temperaturze 90—100° przy dostępie powietrza. Ten sam autor zaleca traktowanie ziarna zawiesiną drożdżową przez 72 godziny w temperaturze 40—50°. Działaniu drożdży i tlenu powietrza przypisuje on wytwarzanie czerwieni kakaowej i aromatu.

Obecnie stosuje się na skalę techniczną prażenie ziarna kakaowego w temperaturze powyżej 100°, a nawet 140°. Fincke zaznacza, że przy prażeniu ziarna zmiana substancji garbnikowych jest mała, a mdławo-gorzki smak czerwieni kakaowej nie ulega zniszczeniu. Pintowski (1948) zwraca uwagę, że przez prażenie nie osiąga się usunięcia cierpkości, kwasowości i surowizny ziarna kakaowego niedojrzałego i niedofermentowanego.

Jak widać z powyższego, dane z literatury są skąpe i różnią się znacznie metodyką. W związku z tym postanowiono wyjaśnić rolę trzech zasadniczych czynników, które ewentualnie mogłyby mieć wpływ na proces wtórnej fermentacji ziarna kakaowego, a więc: 1) wpływ mikroorganizmów, 2) rolę enzymów zawartych w ziarnie kakaowym, 3) wpływ warunków fizyko-termicznych na zmiany smakowe i poszczególne związki chemiczne ziarna kakaowego.

Badania nad „wtórną fermentacją" ziarna kakaowego polegały na przeprowadzeniu:

1) fermentacji drożdżowej przy pomocy drożdży wyizolowanych z ziarna kakaowego i przy zastosowaniu drożdży piekarnianych,
2) moczenia ziarna w wodzie bez przewietrzania i z przewietrzaniem świeżym powietrzem w różnych temperaturach,
3) moczenia ziarna w wodzie z dodatkiem potażu,
4) zwilżania ziarna wodą (30% wody w stosunku do ciężaru ziaren),
5) naparzania ziarna bieżącą parą wodną przez $^1/_2$ godziny,
6) suszenia i prażenia ziarna w różnych temperaturach.

Na podstawie powyższych badań starano się uchwycić pewne zależności przemian organoleptycznych i chemicznych od zastosowanych warunków doświadczalnych oraz wytypować najlepsze metody, które pozwalałyby osiągnąć barwę brunatnoczekoladową liścieni i typowy aromat przy zaniku smaku kwaśnego, cierpkiego i surowizny, a jednocześnie otrzymać ziarno kakaowe kruche i dające się łatwo łuskać. Badania prowadzono nad dwoma gatunkami ziarna kakaowego, konsumpcyjnego z Nigerii i na jednym gatunku ze Złotego Wybrzeża. Ziarno było gatunkowo słabe, mieszane, częściowo skarlałe, niedojrzałe lub niedofermentowane.

W niniejszej pracy główny nacisk położono na szczegółowo przeprowadzoną ocenę organoleptyczną ziarna kakaowego, którego smak korygowano przy pomocy powyżej opisanych metod.

Metodyka badań organoleptycznych polegała na ustaleniu pozytywnych i negatywnych granic dla poszczególnych smaków ziarna kakaowego „przefermentowanego" i surowego. Na podstawie powyżej ustalonych metod oceny organoleptycznej stwierdzano dobrą jakość ziarna kakaowego, posiadającego następujące cechy: aromat, brunat kakaowy i kruchość ziarna osiąga granicę (+), smak gorzko-cierpki i kwaśny utrzymuje się na poziomie (±), zaś smak surowizny i zjełczenia nie występuje.

Przeprowadzone badania mikroskopowe wykazały, jak wielki wpływ na (kruchość) spoistość tkanki liścieni ziarna kakaowego i rozmieszczenie w niej brunatnego barwika mają poszczególne metody „wtórnej fermentacji". Różna spoistość tkanki liścieni uwidacznia się w formie szczelin i spękań, zaś rozmieszczenie brunatnego barwika występuje w formie ściemnienia obrazu. Badania mikrosko-

powe potwierdziły przeprowadzone badania makroskopowe nad ziarnem kakaowym.

Najlepsze wyniki organoleptyczne dało naparzanie ziarna kakaowego bieżącą parą wodną. Ziarno zwilżane wykazało tylko trochę słabszy aromat niż ziarno naparzane. Ziarno moczone zostało bardzo nieznacznie polepszone, zupełnie niezależnie od przewietrzania świeżym powietrzem. W środowisku alkalicznym uzyskano polepszenie barwy, lecz nie osiągnięto lepszego smaku. Ziarno palone wykazało nadmierny smak kwaśny. Przy zastosowaniu „fermentacji drożdżowej" otrzymano nietypowy smak ziarna kakaowego.

Na podstawie otrzymanych wyników okazało się, że:

1. „Fermentacja drożdżowa" jest nieodpowiednia do polepszania smaku ziarna kakaowego. Barwę brunatną oraz identyczne cechy organoleptyczne otrzymano w tych samych warunkach dla ziarna zwilżanego wodą. Na tej podstawie wyniki „fermentacji drożdżowej" należy uznać za negatywne, co prawdopodobnie wyklucza współdziałanie mikroorganizmów w procesie „wtórnej fermentacji" ziarna kakaowego.
2. Pozytywne wyniki, otrzymane przy naparzaniu ziarna kakaowego bieżącą parą wodną przez $^1/_2$ godziny i suszeniu go w temperaturze powyżej maksymalnej dla działalności enzymatycznej, tzn. w 80—120°, wykluczają rolę enzymów roślinnych w procesie „wtórnej fermentacji", zaś wyraźnie wykazują wpływ warunków fizyko-termicznych na korygowanie wad smakowych ziarna kakaowego.

Na podstawie badań analitycznych stwierdzono odwrotną proporcjonalność między ilością czerwieni kakaowej, występującej w ziarnie kakaowym, a ilością cukrów oznaczonych po długiej inwersji.

Metoda naparzania i suszenia ziarna kakaowego, opracowana na skalę laboratoryjną, została potwierdzona jako odpowiednia na skalę techniczną i otrzymano przy jej zastosowaniu lepszą jakość czekolady niż przy dotychczasowej metodzie prażenia ziarna.

Powyższe badania wykazały, że proces „wtórnej fermentacji" ziarna kakaowego był mylnie dotąd uważany za proces biologiczny (wpływ drożdży i enzymów kakaowych). Na podstawie powyższych badań należałoby zmienić nazwę „wtórna fermentacja" ziarna kakaowego na bardziej odpowiednią, gdyż proces korygowania wad smakowych ziarna kakaowego nie ma nic wspólnego z rzeczywistą fermentacją biologiczną.

Г. Ржендовска

ПРОБЛЕМА ВТОРИЧНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ КАКАОВЫХ ЗЕРЕН НА ОСНОВАНИИ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Резюме

Установлено, что так называемая вторичная ферментация какаового зерна не является биологическим процессом. Автор сопоставил и оценил разные методы приготовления какаовых зерен.

H. Rzędowska

THE INVESTIGATIONS ON THE FERMENTATION OF CACAO BEANS

Summary

It was shown that the microorganism are not involved in normal fermentation of cacao beans. The author describes the procedure for improving the flavor and colour of seeds.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

B. Smyk

BADANIA MIKROBIOLOGICZNE I BIOCHEMICZNE NAD RACJONALIZACJĄ KISZENIA — SILOSOWANIA PASZ

Z Zakładu Mikrobiologii Rolnej UJ w Krakowie

Badania niniejsze miały na celu dalsze udoskonalenie techniki konserwacji pasz przez określenie optymalnych warunków kiszenia różnych roślin zielonych z różnymi dodatkami węglowodanowymi metodą tzw. „zimnej fermentacji". Starano się, by w oparciu o podstawowe zasady silosowania — w każdym wypadku można było wybierać taki system zakiszania, jaki będzie najbardziej celowy i dogodny dla każdego gospodarstwa.

Celem tych badań było:

a) szczegółowe ilościowe i jakościowe zbadanie stanu mikroflory (bakterii homo- i heterofermentacyjnych kwasu mlekowego, bakterii gnilnych, bakterii grupy pałeczki okrężnicy, bakterii kwasu masłowego, bakterii octowych oraz drożdżaków i pleśniaków) w kiszonkach o różnym składzie surowcowym podczas wstępnych i zasadniczych faz dojrzewania zakiszanej paszy,

b) zbadanie wpływu dodatków łatwo scukrzających się (melasa, ześrutowane zboże — owies, żyto, gotowane ziemniaki) na logarytmiczną fazę przyrostu bakterii kwasu mlekowego,

c) określenie optymalnych warunków fizyko-chemicznych środowiska,

d) zastosowanie oceny organoleptycznej z uwzględnieniem prób testowych „efektu żywieniowego" — w odniesieniu do wszystkich badanych kiszonek,

e) orientacyjne zbadanie wpływu zastosowania zakwasów bakterii kwasu mlekowego przy zakiszaniu roślin trudno zakiszających się,

f) porównawczo-kontrolne zbadanie kiszonek otrzymanych metodą tzw. „zimnej fermentacji" oraz metodą „gorącej fermentacji" przy użyciu prądu elektrycznego o dużej częstotliwości (elektrofermentacja).

Badania dotyczące całokształtu zagadnień związanych z powyższym tematem zostały przeprowadzone w 10 silosach w r. 1951 i powtórzone w roku 1952 w 17 silosach w okresie letnim oraz w 19 silosach w okresie jesiennym.

Doświadczenia w r. 1951 zostały wykonane w 6 silosach doświadczalnych w miejscowości G. i w 4 silosach znajdujących się w M. (należących do Instytutu Zootechniki).

Skład silosów:

Nr G. 1. — trawa bez żadnych dodatków,
2. koniczyna z 3% dodatkiem śruty owsianej,
3. lucerna z 3% dodatkiem śruty owsianej,
4. lucerna z 3% dodatkiem śruty żytniej,
5. lucerna z 2% dodatkiem melasu,
6. koniczyna z 10% dodatkiem parowanych ziemniaków.

Nr M. 1. — koński ząb bez żadnych dodatków,
2. koński ząb bez żadnych dodatków,
3, 4. mieszanka wyki z owsem (60%) i słonecznik (40%).

Doświadczenia przeprowadzane w r. 1952:

a) w okresie letnim:

Nr G. 1,2,4— kontrolne na trwałość kiszonki,
3, 5. koniczyna z 4% dodatkiem ześrutowanego owsa,
6, 7. lucerna z 3% dodatkiem ześrutowanego żyta,
8. lucerna z 10% dodatkiem traw + 2% dodatek śruty żytniej,
9. lucerna z 20% „ „ + 1% „ „ owsianej,
10. koniczyna z 10% „ „ + 2% „ „ żytniej,
11. koniczyna z 20% „ „ + 1% „ „ owsianej (zastosowanie zakwasu kiszonkowego)
12. lucerna z 30% dodatkiem traw,
13. lucerna z 40% dodatkiem traw,
14. koniczyna z 30% dodatkiem traw,
15. koniczyna z 40% dodatkiem traw,

Nr M. 1,2 — koński ząb bez dodatków.

b) w okresie jesiennym:

Nr G. 1,2,4 —kontrolne na trwałość kiszonki,
3, 5. koniczyna z 4% dodatkiem śruty owsianej,
6. lucerna z 2% dodatkiem melasu,
7. lucerna z 4% dodatkiem śruty owsianej,
8. lucerna z 3% dodatkiem śruty żytniej,
9. lucerna z 10% dodatkiem ziemniaków parowanych,
10. lucerna z 10% dodatkiem topinamburu,
11. lucerna z 10% dodatkiem wytłoków,
12. lucerna z 4% dodatkiem śruty owsianej (zastosowanie zakwasu kiszonkowego),
13. lucerna z 3% dodatkiem śruty żytniej (zastosowanie zakwasu kiszonkowego),
14. koniczyna z 4% dodatkiem śruty owsianej,
15. koniczyna z 3% dodatkiem śruty żytniej.

Nr M. 1,2 — mieszanka wyki z owsem (60%) + słonecznik (40%),
Nr B. 1,2 — mieszanka wyki z owsem + ziemniaki parowane.

Mikrobiologiczne badania ilościowe i jakościowe zostały przeprowadzone przy zastosowaniu następujących podłóż ogólnych: agar zwykły, agar z wyciągiem kiszonkowym, agar brzeczkowy oraz specjalnych podłóż wybiórczych:

1. podłoże Blickfeldta — dla heterofermentacyjnych bakterii kwasu mlekowego,
2. podłoże Demetera — dla homofermentacyjnych bakterii kwasu mlekowego,
3. podłoże Virtanena i Tarnanena — dla bakterii gnilnych,
4. podłoże Virtanena i Tarnanena — dla bakterii masłowych,
5. podłoże Henneberga I — dla bakterii octowych,
6. zmodyfikowane podłoże Levina-Simmonsa — dla bakterii grupy pałeczki okrężnicy,

7. agar brzeczkowo-kiszonkowy — dla drożdżaków i pleśniaków,
8. żelatyna z wyciągiem kiszonkowym — dla bakterii proteolitycznych.

W próbkach badanych kiszonek (pobieranych specjalnym świdrem kiszonkowym) oznaczano ilość i jakość występującej mikroflory, kwasowość przy pomocy potencjometru i temperaturę silosu przy użyciu specjalnego termometru kiszonkowego. W każdym z wymienionych silosów wykonano przeciętnie po 15 analiz mikrobiologicznych, 15 pomiarów kwasowości i 16 pomiarów temperatury.

Reasumując korelację uzyskanych wyników z okresów doświadczalnych, a to w badaniach mikrobiologicznych, fizyko-chemicznych i organoleptycznych, można powiedzieć, że kiszonki o składzie: 1. trawa bez żadnych dodatków, 2. lucerna z dodatkiem śruty owsianej, 3. lucerna z dodatkiem śruty żytniej, 4. lucerna z dodatkiem melasu, 5. koniczyna z dodatkiem śruty owsianej, 6. koński ząb bez dodatków, 7. ziemniaki parowane z mieszanką wyki z owsem — wykazały w środkowym i końcowym stadium fermentacji optymalne warunki kwasowości (kryterium jakości kiszonek pH = ± 4,2), dobrą i właściwą temperaturę (+ 25—30°) i największą ilość bakterii fermentacji mlekowej (w tzw. fazie fermentacji zasadniczej). Otrzymane wyniki zostały potwierdzone w próbach tzw. „efektu żywieniowego".

Zgodnie z teorią „minimum cukrowego" (Zubrilin, Miszustin, Charczenko) użyte do doświadczeń silosowych rośliny (lucerna, koniczyna, wyka) należą do grupy roślin trudno zakiszających się. Pojęcie „minimum cukrowego" określa taki procent cukru, jaki jest niezbędny dla nagromadzenia kwasu mlekowego w zakiszanej paszy w ilości zapewniającej obniżenie kwasowości kiszonki do pH = 4,2 przy dużej zdolności buforowej danego surowca.

Tabela I

Proces dojrzewania mieszanki wyki z owsem i ziemniakami (w 1 g kiszonki)

Процесс созревания силоса из смеси вики с овсом и картофелем

Fermentation of the silage from the mixture of potatoes, oats and vetch

Przedmiot obserwacji	Wiek kiszonki w dniach					
	Materiał wyjściowy	12 godz.	3 dni	6 dni	12 dni	30 dni
	(dane liczbowe w milionach)					
Ogólna liczba bakterii	80	195	240	310	84	62
Bakterie kwasu mlekowego	0,006	0,008	182	200	69	44
	(faktyczne dane liczbowe)					
Grupa *coli-aerogenes*	680	720	1250	420	0	0
Bakterie kwasu masłowego	380	50000	18000	4500	0	0
pH	6,0	—	4,9	4,3	4,2	4,0

Ponieważ w wymienionych roślinach zawartość cukru jest mniejsza od minimum cukrowego — dodawano produkty cukrowe lub łatwo scukrzające się (np. melasa, gotowane ziemniaki lub śruta zbożowa). Uzyskane wyniki naszych doświadczeń potwierdziły słuszność teorii „minimum cukrowego".

Na podstawie uzyskanego obrazu mikrobiologicznego i krzywych wskazujących spadek pH, np. przy kiszonce wyżej wymienionej, można powiedzieć, że zasadnicze procesy fermentacyjne w parowanych ziemniakach i mieszance wyki z owsem odbywają się w ciągu 3—5 dni (tabl. I). W ciągu tego krótkiego czasu na skutek szybkiego zakiszania masy nie rozwija się niepożądana mikroflora (bakterie kwasu masłowego, bakterie gnilne itp.). W kiszonkach o innym składzie surowcowym procesy te przebiegają nieco dłużej. (Odnosi się to do kiszonek nr nr 1, 2, 3, 4, 5 i 6).

Pozostałe kiszonki nie wykazywały właściwej — pożądanej dominacji bakterii fermentacji mlekowej w drugiej i trzeciej fazie ukwaszania. Temperatura dochodziła do 36°, a kwasowość wahała się w granicach pH = 5,3—4,6. W danych wypadkach należy się dopatrywać niedoboru węglowodanów (cukrów) zgodnie z teorią „minimum cukrowego" oraz złego ubicia kiszonki.

Próbne zastosowanie zakwasu bakterii kwasu mlekowego, w 3 silosach przyczynia się do szybkiej dominacji (3 dni) bakterii kwasu mlekowego, a tym samym do właściwego ukwaszania — poprawiając jakość trudno zakiszających się roślin (spadek pH w porównaniu z kontrolą i wzrost kwasu mlekowego do 1,2% w porównaniu z kontrolą = 0,74%).

Na podstawie uzyskanych wyników można powiedzieć, że metoda tzw. „zimnej fermentacji" silosowania pasz o podanym wyżej składzie wykazała w naszych warunkach dobre zalety konserwujące dając bardzo dobrą, pełnowartościową i witaminową (witamina A — karoten) kiszonkę (paszę).

Kontrolno-porównawcze badania kiszonek prowadzonych metodą „gorącej fermentacji" z zastosowaniem prądu elektrycznego o dużej częstotliwości są projektowane na rok następny.

Б. Смык

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НАД РАЦИОНАЛИЗАЦИЕЙ СИЛОСОВАНИЯ КОРМОВ

Резюме

Производились микробиологические и биохимические исследования 46 силосов различного состава.

Из исследуемых силосов 6 ниже следующего состава:

1) Трава без добавок
2) Люцерна + дробленное овсяное или ржаное зерно
3) Люцерна + меласс
4) Клевер + дробленное зерно овса
5) Кукуруза зубовидная без добавок
6) Запаренная картофель + смесь вики с овсом

проявили в серединной и конценой фазах брожения оптимальную кислотность (pH + 4,2), требуемую температуру (от 25° до 30°), а найбольшее количество молочнокислых бактерий в так называемой фазе основной ферментации (Табл. 1).

Эти результаты получили подтверждение в пробах „эффективности кормления".

B. Smyk

MICROBIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL INVESTIGATIONS DURING SILAGE PREPARATION

Summary

Microbiological and chemical examinations were conducted on 46 samples of silages, prepared in various ways. In the six silages prepared from: 1) grass, 2) lucerne + rough grinded rye or oats-corn, 3) lucerne + molasses, 4) clover + grinded oats corn, 5) horse corn, 6) steamed potatoes + a mixture of oats and vetch, ensues the proper fermentation. In the middle- and final-phase of fermentation there was noted the adequate acidity (pH = 4,2), temperature (25 -- 30°) and the vigorous growth of lactic acid bacteria (Table I).

The nutritive value of these silages was ascertained in feeding experiments of farm animals.

Acta Microbiologica Polonica Vol. II, No 2—3

A. Szember

MIKROFLORA KISZONEK ZIEMNIACZANYCH

Z Zakładu Mikrobiologii Rolnej UMCS w Lublinie

Celem omawianej pracy było poznanie przemian zachodzących w składzie mikroflory podczas procesu zakiszania ziemniaków, do których dodano różne produkty białkowe. Chcąc znaleźć sposób przyrządzania z tak ubogiej w białko paszy, jaką jest ziemniak, kiszonek pełnowartościowych pod względem odżywczym a zarazem trwałych, smacznych i zdrowych, autor dodawał do ziemniaków zmienne ilości sieczki z roślin motylkowych lub też białka zwierzęcego w postaci tzw. „chwastu rybnego".

Kiszonki przyrządzano w skali laboratoryjnej i półtechnicznej, przechowując je w temp. 16 — 18° w ciągu kilku miesięcy. Mikrobiologiczne badania przeprowadzano codziennie w ciągu pierwszych 10 dni zakiszania, a następnie po 14 i 21 dniach oraz po kilku miesiącach fermentacji. Analizy chemiczne (ilości kwasów met. Leppera) wykonano po upływie 3 i po 21 miesiącach.

Współpracowano z Zakładem Żywienia Zwierząt UMCS w Lublinie, gdzie zostały wykonane analizy chemiczne i próby żywieniowe na baranach i prosiętach.

Analizy mikrobiologiczne obejmowały w szczególności oznaczanie na pożywkach elektywnych ilości bakterii fermentacji mlekowej, proteolitycznych, *coli-aerogenes* oraz drożdży w dwóch rodzajach kiszonek: z parowanych ziemniaków z dodatkiem 20% koniczyny (tabl. 1) i z parowanych ziemniaków z dodatkiem 7,5% ryby (rys. 1). Badania te powtórzono w 7 doświadczeniach pierwszego i 1 doświadczeniu drugiego typu.

Jak widzimy, przebieg procesów fermentacyjnych w kiszonkach z ziemniaków z dodatkiem świeżej koniczyny był w naszym doświadczeniu zawsze prawidłowy. Szybki rozwój mikroorganizmów kwaszących i związany z tym spadek pH hamował rozwój bakterii proteolitycznych i bakterii z grupy *coli-aerogenes*. Tylko rozwój drożdży nie ulegał depresji.

Stosując dodatek do ziemniaków 20 — 40% koniczyny, otrzymano kiszonki o przyjemnym zapachu i dużej trwałości. Kiszonki te, przechowywane przez okres 1 roku, nie ulegały zepsuciu i były łakomie zjadane przez zwierzęta (barany).

Analizy chemiczne wykazały wysoką wartość kiszonek ziemniaczanych z koniczyną. Zawierały one: kwasu mlekowego 2,5% , kwasu octowego 0,6% i kwasu masłowego do 0,09%. Kiszonki te miały pH w granicach 4,0 — 4,2 i niższe. Oceniając je przy pomocy klucza Fliega, uznano je za bardzo dobre.

Dodając do ziemniaków 7,5% wag. „chwastu rybnego", uzyskano kiszonko wysokiej wartości odżywczej, prawidłowym przebiegu procesów fermentacyjnych i dużej trwałości. Niektóre dane mikrobiologiczne zebrano w wykresie 1.

Analizy chemiczne kiszonek ziemniaczanych z dodatkiem ryby przeprowadzone przez dr Kolowcę (Zakład Żywienia Zwierząt UMCS w Lublinie) wykazały w nich ok. 3,5% kwasu mlekowego, ok. 0,5% kwasu octowego i ok. 0,02% kwasu masłowego. Kiszonki te miały pH 3,8. Przeprowadzone przez dr Kolowcę próby żywieniowe na prosiętach wykazały dużą wartość odżywczą skarmianych kiszonek.

W Zakładzie Mikrobiologii Rolnej UMCS w Lublinie przeprowadza się również próby zastąpienia w kiszonkach ziemniaków przez kłęby topinamburu.

Tabela 1

Ilość różnych grup drobnoustrojów w tysiącach na 1,0 g świeżej masy koniczyny. Kombinacja: ziemniaki parowane + 20% koniczyny

Количество разных групп микроорганизмов в тысячах на 1 г сырой массы силоса. Комбинация: запарённый картофель + 20% клевера

The number of microorganisms in potato silage (in thousands per 1,0 g). Steamed potatoes +20 per cent of clover

Rodzaj drobnoustrojów	Ilość dni fermentacji						
	0	1	2	3	4	5	6
Bakterie fermentacji mlekowej	10	770 000	2 600 000	1 700 000	830 000	570 000	2 000 000
Bakterie z grupy *coli-aerogenes*	<0,1	1,2	20	1,6	<0,1	<0,1	—
Bakterie proteolityczne	0,5	8	10	10	<10	<1	<1
Drożdże	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,7	2,4	8,3

Rodzaj drobnoustrojów	Ilość dni fermentacji						
	7	8	9	10	14	21	42
Bakterie fermentacji mlekowej	1 200 000	1 200 000	1 200 000	1 100 000	990 000	750 000	40 000
Bakterie z grupy *coli-aerogenes*	—	—	—	—	0	0	0
Bakterie proteolityczne	<1	<1	<1	—	0	0	0
Drożdże	36	41	130	160	—	—	1 700

Objaśnienie znaków: — nie badano, 0 — brak.

Rys. 1. Rozwój różnych grup drobnoustrojów w kiszonce z ziemniaków z dodatkiem 7,5% „chwastu rybnego". Czas trwania badań — 4 miesiące. Ilości podane w skali logarytmicznej.

Рис. 1. Развитие разных групп микроорганизмов в картофельном силосе с прибавлением 7,5% рыбы. Время опыта — 4 месяца. Количество микроорганизмов в 1 г сырой массы силоса в логарифмах

Fig. 1. The developpment of different groups of microorganisms in silages prepared from steamed potatoes + 7,5 per cent of small fish. Time of experiment — 4 months. Logarythms of number of microorganisms per 1 g of fresh silage.

— — — — bakterie mlekowe;	молочнокислые бактерии;	lactic acid bacteria
. . . . . bakterie z grupy *coli-aerogenes*;	бактерии *coli-aerogenes*;	*coli-aerogenes* group
— . — . bakterie proteolityczn	протеолитические бактерии;	proteolytic bacteria
+ + + + drożdże;	дрожжи;	yeasts

OGÓLNE WNIOSKI

1. Stwierdzono prawidłowy przebieg procesów fermentacyjnych w kiszonkach sporządzonych z ziemniaków, do których dodano świeżej koniczyny lub tzw. „chwastu rybnego"(patrz tabl. I i wykres 1). Analizy chemiczne kiszonek ziemniaczanych z dodatkiem koniczyny lub drobnicy rybnej, przeprowadzane przy pomocy metody Leppera, wykazały prawidłowy stosunek kwasu mlekowego do octowego i masłowego. Kiszonki te miały pH zawsze w granicach 4,0 — 4,2 i niższe, co w dostatecznym stopniu zabezpieczało je przed zepsuciem.
2. Kiszonki w ten sposób przyrządzone były chętnie zjadane przez zwierzęta.

A. Шембер

МИКРОФЛОРА КАРТОФЕЛЬНЫХ СИЛОСОВ

Резюме

В лаборатории по Сельско-хозяйственной Микробиологии У.М.К.С. в Люблине были произведены эксперименты с картофельными силосами, которые обогащались белками путем добавок свежего клевера или так называемой „рыбной мелочи".

Полученные результаты оказались положительными.

1) Установлено правильное направление бродильных процессов в силосах из картофеля с добавкой свежего клевера или так называемой „рыбной мелочи" (см. таб. 1 и рис. 1). Химический анализ картофельных силосов с добавкой клевера или рыбной мелочи, производимый по методу Леппера, обнаружил правильное соотношение молочной, уксусной и масляной кислот. У этих силосов pH колебалось в границах от 4,0 до 4,2, достигая иногда и меньших величин, что в достаточной степени предохраняло их от порчи.

2) Силосы, таким образом приготовленные, охотно были съедаемы животными.

A. Szember

MICROFLORA OF POTATO-SILAGES

Summary

These investigations were conducted on the silages from potatoes mixed with clover or with fish.

The normal fermentation ensued (Table I, Fig. 1). The ratio of the concentration of lactic acid to concentrations of acetic and butyric acids was also normal. The acid formed during fermentation (pH 4,0 — 4,2) inhibits the putrefactive changes.

The feeding value of the silages is now investigated.

OBJAŚNIENIA DO TABLICY I

Do artykułu R. Kowalika i E. Czerwińskiej — str. 111.

Fot. 1. Wpływ czterochloro-p-benzochinonu na wzrost *Alternaria*
Влияние четверохлор-р-бензохинона на *Alternaria*
Effect of tetrachlor-p-benzoquinone on the growth of *Alternaria*
a — kontrola
b — płytka z roztworem 0,06% czterochloro-p-benzochinonu

Fot. 2. Wpływ czterochloro-p-benzochinonu na wzrost *Fusarium sp.*
Влияние четверохлор-р-бензохинона на *Fusarium sp.*
Effect of tetrachlor-p-benzoquinone on the growth of *Fusarium sp.*
a — kontrola
b — płytka z roztworem 0,03% czterochloro-p-benzochinonu
c — „ „ „ 0,06% „ „ „

Fot. 3. Wpływ czterochloro-p-benzochinonu na wzrost *Cladosporium*
Влияние четверохлор-р-бензохинона на *Cladosporium*
Effect of tetrachlor-p-benzoquinone on the growth of *Cladosporium*
a — kontrola
b — płytka z roztworem 0,03% czterochloro-p-benzochinonu
c — „ „ „ 0,06% „ „ „

Fot. 4. Wpływ 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonu na wzrost *Cladosporium*
Влияние 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона на *Cladosporium*
Effect of 2,3-dichlor-1,4-naphtaquinone on the growth of *Cladosporium*
a — kontrola
b — płytka z roztworem 0,0002% 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonu

OBJAŚNIENIA DO TABLICY II

Do artykułu J. Hozoszewicza, str. 121.

Fot. 1. *E. coli.* Wczesne stadium rozwoju komórek olbrzymich formy *L* na powierzchni agaru. Preparat niebarwiony. 1300 x
E. coli. Ранняя стадия развития шаровидных клеток формы *L* на поверхности агара. Препарат неокрашенный. Увел. 1300 x
E. coli. The early stadium of formation of „large round bodies" on the agar-plate. Unstained. 1300 x

Fot. 2. *E. coli.* Kolonie *L*. Dalsze stadia rozwojowe. Komórki „gruszkowate" z „wodniczkami" w dole, po lewej stronie „przestrzeń pusta". Preparat nie barwiony. 1300 x
E. coli. Колонии формы *L*, дальнейшие стадии развития. Грушевидные клетки с вакуолями. Внизу с левой стороны „пустое пространство". Неокрашенный препарат. Увел. 1300 x
E. coli. Colony of the *L*-form. Pear-shaped and vacuolised cells. To the left — „empty place". Unstained. 1300 x

Fot. 3. Krawędź 36-godzinnej kolonii formy *L.* Z prawej strony — powstające normalne pałeczki
E. coli. Край 36-и часовой колонии формы *L.* С правой стороны возникающие нормальные палочки. Увел. 1300 x
The edge of 36-hours colony of the *L*-form. Formation of rod-shaped forms is to be seen to the right of a picture. Unstained. 1300 x

Do artykułu J. Jakubowskiej i współpracowników, str. 177.

Fot. a. *T. utilis*, szczep *IIb*. Reakcja glikogenowa
T. utilis штамм II b гликогенная реакция.
T. utilis, strain *IIb*, glicogen globules

Fot. b. *T. utilis*, szczep *IIb*. Komórki z błonki (kożuszka) parodniowej hodowli
T. utilis, Клетки из пленки нескольководневной культуры
T. utilis, strain *IIb*, from the pellicle in the older culture

OBJAŚNIENIA DO TABLICY III

Do artykułu Z. Dymowskiej i A. Feltynwskiego, str. 125.

Fot. 1. *Leptospira canicola*. Hodowla 10-dniowa. Pow. 6 400x. Preparat nie cieniowany
L. canicola 10-дневная культура. 6 400 x
Leptospira canicola. 10-days culture. Unshadowed. 6 400 x

Fot. 2. *Leptospira icterohaemorrhagiae*. Hodowla 7-miesięczna. Pow. 5 600 x. Preparat nie cieniowany
L. icterohaemorrhagiae. 7-месячная культура. 5 600 x
Leptospira icterohaemorrhagiae. 7-months culture. Unshadowed. 5 600 x

Fot. 3. *Leptospira canicola*. Hodowla 2-miesięczna. Pow. 4 500 x. Preparat cieniowany chromem
L. canicola.2-месячная культура. Импрегнация хромом. 4 500 x
Leptospira canicola. 2-months culture. Chromium shadowed. 4 500 x

Fot. 4. *Leptospira canicola*. Hodowla 3-miesięczna. Pow. 4 750 x. Preparat cieniowany chromem
L. canicola. 3-месячная культура. Импрегнация хромом. 4 750 x
Leptospira canicola. 3-months culture. Chromium shadowed. 4 750 x

Fot. 5. *Leptospira canicola*. Hodowla 14-dniowa. Pow. 5 400 x. Preparat nie cieniowany
L. canicola. 14-дневная культура. 5 400 x
Leptospira canicola. 14-days culture. Unshadowed. 5 400 x

Fot. 6. *Leptospira grippo-typhosa*. Hodowla 2-miesięczna. Pow. 5 700 x. Preparat cieniowany chromem
L. grippo-typhosa. 2-месячная культура. Импрегнация хромом. 5 700 x
Leptospira grippo-typhosa. 2-months culture. Chromium shadowed. 5 700 x

OBJAŚNIENIA DO TABLICY IV

Do artykułu Z. Dymowskiej i A. Feltynwskiego, str. 125.

Fot. 7 *Leptospira grippo-typhosa*. Hodowla 5-miesięczna. Pow. 5 200 x. Preparat nie cieniowany
L. grippo-typhosa - 5-месячная культура. 5 200 x
Leptospira grippo-typhosa. 5-months culture. Unshadowed. 5 200 x

Fot. 8. *Leptospira grippo-typhosa*. Hodowla 7-miesięczna. Pow. 7 500 x. Preparat nie cieniowany
L. grippo-typhosa. 7-месячная культура. 7 500 x
Leptospira grippo-typhosa. 7-months culture. Unshadowed. 7 500 x

Fot. 9. *Leptospira canicola.* Hodowla 2-miesięczna. Pow. 4 600 x. Preparat cieniowany chromem

L. canicola. 2-месячная культура. Импрегнация хромом. 4 600 x

Leptospira canicola. 2-months culture. Chromium shadowed. 4 600 x

Fot. 10. *Letospira canicola.* Hodowla 4-tygodniowa. Pow. 5 400 x. Preparat cieniowany chromem

L. canicola. 4-недельная культура. Импрегнация хромом. 5 400 x

Leptospira canicola. 4-weeks culture. Chromium shadowed. 5 400 x

Fot. 11. *Leptospira grippo-typhosa.* Hodowla 2-tygodniowa. Pow. 6 300 x. Preparat nie cieniowany

L. grippo-typhosa. 2-недельная культура. 6 300 x

Leptospira grippo-typhosa. 2-weeks culture. Unshadowed. 6 300 x

Fot. 12. *Leptospira grippo-typhosa.* Hodowla 2-tygodniowa. Pow. 6 300 x. Preparat cieniowany palladem

L. grippo-typhosa. 2-недельная культура. Импрегнация палладием. 6 300 x

Leptospira grippo-typhosa. 2-weeks culture. Palladium shadowed. 6 300 x

TABLICA V i VI

Fot. 1 — 6

Do artykułu E. Czerwińskiej, I. Sadurskiej i D. Kozłowskiej, str. 160

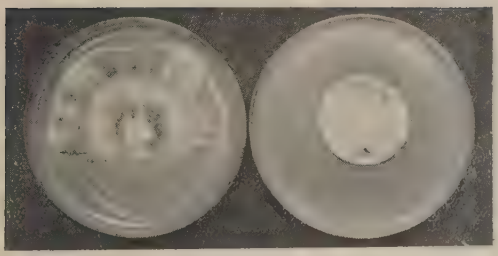
Promieniowce niszczące papier zabytkowy

Актиномицеты разрушающие бумагу.

Actinomycetes damaging the paper

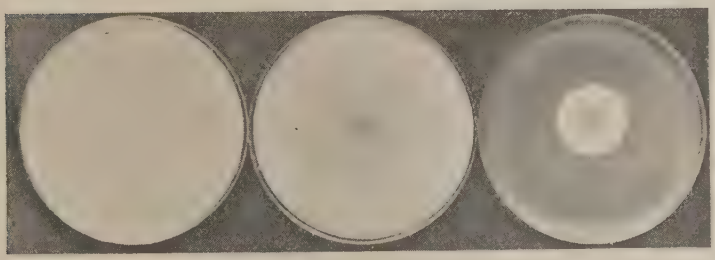
Tablica I

Fot. 1



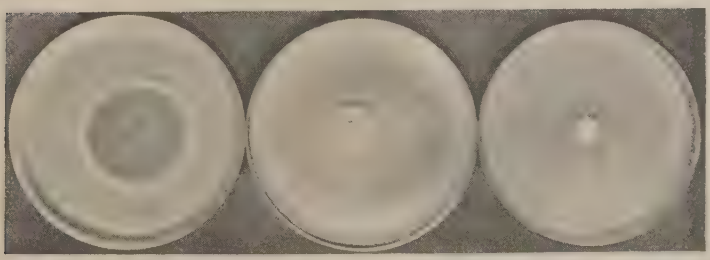
a b

Fot. 2



a b c

Fot. 3

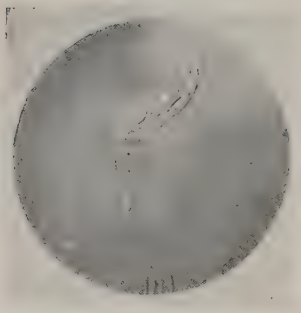


a b c

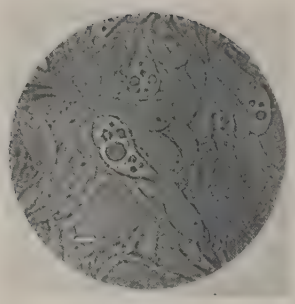
Fot. 4

a b

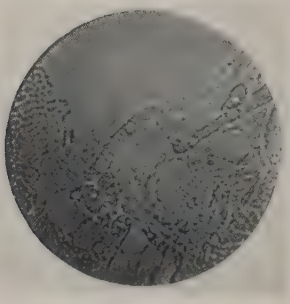
Tablica II



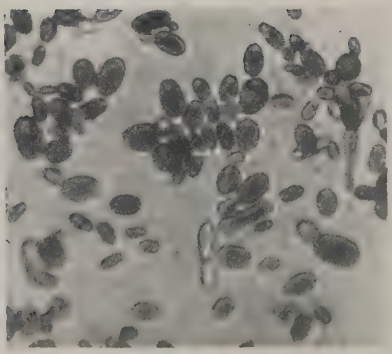
Fot. 1



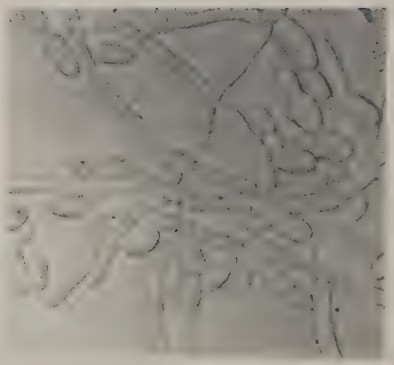
Fot. 2



Fot. 3

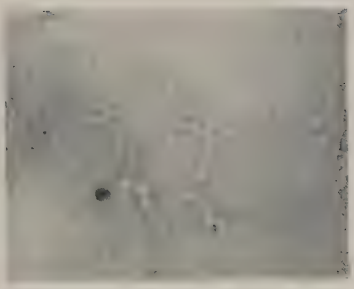


Fot. A

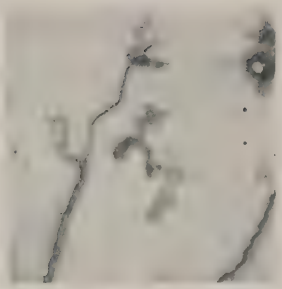


Fot. B

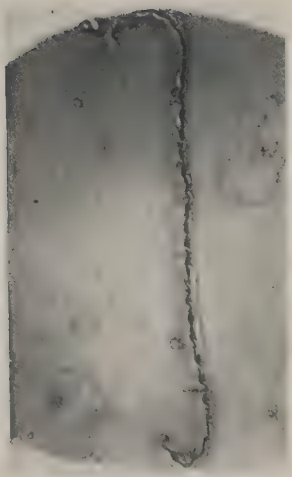
Tablica III



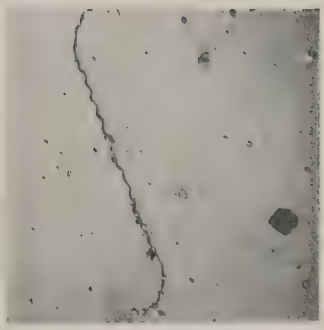
Fot. 1



Fot. 2



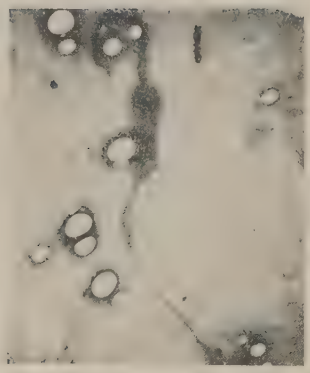
Fot. 3



Fot. 4

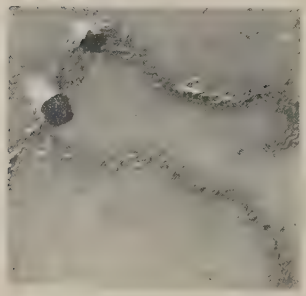
Fot. 5

Fot. 6

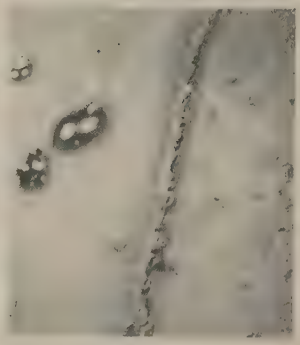


Fot. 7

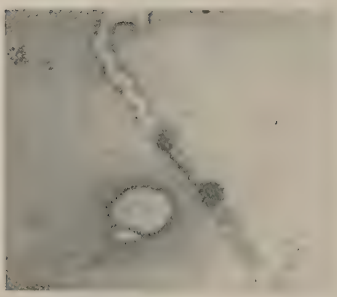
Fot. 8



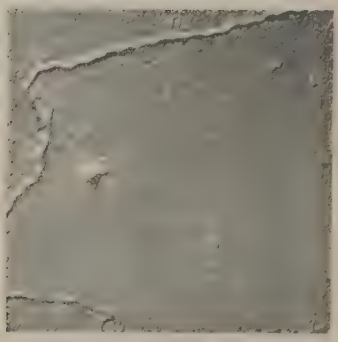
Fot. 9



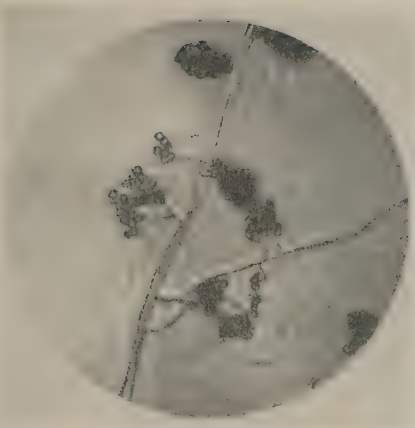
Fot. 10



Fot. 11

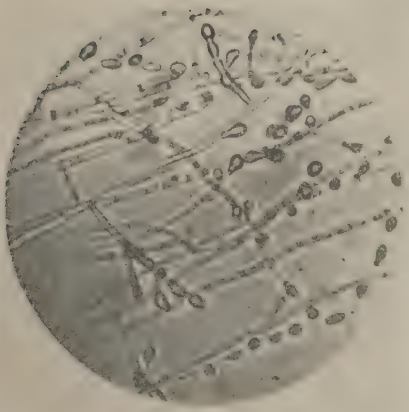


Fot. 12

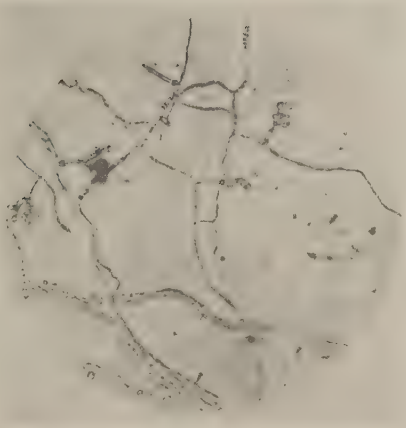


Fot. 1

Fot. 2

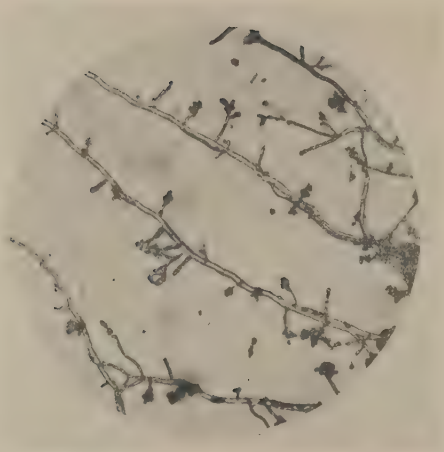


Fot. 3



Fot. 4

Fot. 5



Fot. 6

SPIS TREŚCI

Str.

1. O. Sakławska-Szymonowa: Wpływ miedzi na wzrost i zużytkowanie glukozy w płynnych hodowlach *Escherichia coli*. 99
2. R. Kowalik i E. Czerwińska: Grzybobójcze działanie czterochloro-p-benzochinonu i 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonu 111
3. J. Horoszewicz: Z badań nad postaciami *L* drobnoustrojów. . . . 121
4. Z. Dymowska i A. Feltynowski: Leptospiry w mikroskopie elektronowym 125
5. K. Obojska: Rozkład węglowodorów nasyconych i nienasyconych przez mykobakterie saprofityczne 129
6. T. Teisseyre: Wpływ sterylizacji na pH podłoża w zależności od jego składu 133
7. Z. Kuryło i I. Pitekówna: Wpływ różnych warunków suszenia na żywotność niektórych szczepów bakteryjnych 139
8. M. Horst i R. Kotelba: Laboratoryjny sposób utrwalania i przechowywania szczepów bakteryjnych 142
9. T. Jastrzębski, J. Kochański i St. Uszyński: Regeneracja agaru 145
10. S. Degen-Brandes: Metoda szybkiego różnicowania kolonii „*O*" rodzaju *Proteus* i pałeczek *Enterobacteriaceae* 147
11. J. Kwapiński i H. Pietraszkiewicz: Zmienność barwikotwórcza *Pseudomonas aeruginosa* i *Serratia marcescens* pod wpływem alkaloidów fenantrenowych 149
12. J. Opieńska-Blauth i H. Iwanowski: Wpływ selenu na wzrost i przemianę węglowodanową w płynnych hodowlach *Escherichia coli*. . . 150
13. T. Lityński i H. Jurkowska: Glaukonit jako źródło potasu dla kropidlaka czarnego (*Aspergillus niger*) 150
14. K. Matusiak: Badania nad wykorzystaniem potasu przez *Aspergillus niger* z tufu Filipowickiego 150
15. H. Pikulska: Porównanie i ocena liczenia bakterii metodą płytkową i metodą kropelkową 150
16. Z. Michna i H. Mazaraki: Antagonizm bakteryjny w mleku. . 150
17. J. Kowalska, M. Sabbo i Wł. Kunicki-Goldfinger: Maczugowce glebowe. Cz. I Własności morfologiczne i wzrostowe. . . . 150
18. B. Tuszyńska, K. Dygdała i Wł. Kunicki-Goldfinger: Maczugowce glebowe. Cz. II Własności fizjologiczne. 150
19. M. Urbańska, Wł. Stachal i Wł. Kunicki-Goldfinger: Maczugowce glebowe. Cz. III Cytologia 150
20. H. Doleżko, D. Miłkowska i Wł. Kunicki—Goldfinger: Maczugowce glebowe. Cz. IV Rozkład węglowodorów 150

str.

21. A. Stolarska i Wł. Kunicki-Goldfinger: Maczugowce glebowe. Cz. V Występowanie w niektórych typach gleb 150
22. Wł. Kunicki-Goldfinger: Maczugowce glebowe. Cz. VI Stanowisko systematyczne 150
23. A. Luchterowa: Geomikrobiologia w przemyśle naftowym 151
24. J. Ziemięcka: Osiągnięcia i plany Mikrobiologii Rolniczej. 154
25. W. Maliszewska: Wpływ szczepienia azotobakterem na plony roślin niemotylkowych 154
26. K. Kuźniar: O jednostkach porównawczych w mikrobiologii gleby. . 154
27. N. Balicka: Wpływ stopnia wilgotności gleby w momencie jej uprawy na własności fizyczne i mikroflorę 155
28. Z. Kanicka, K. Kendrzeńska, S. Mass, E. Piotrowska, H. Tomczyk i Z. Wolnicka: Badania wód studziennych na terenie m. Łodzi 155
29. A. Timler, K. Ogrodowczyk i Z. Ońko: Badania fizykochemiczne i mikrobiologiczne wód rzeki Łódki. 157
30. M. Morzycka i H. Wysoczyńska: Porównanie metody fermentacyjnej i filtracyjnej określania miana *coli* w wodzie z zastosowaniem błon filtracyjnych własnej produkcji. 159
31. E. Czerwińska, I. Sadurska i D. Kozłowska: Promieniowce niszczące papier zabytkowy 160
32. K. Kluczycki: Biologiczna odporność stosowanych izolacji asfaltowych 161
33. A. Trawiński: Wpływ zakwaszenia na obecność drobnoustrojów w mięsie 170
34. T. Zachorowski: Mikroflora dorszy Zatoki Gdańskiej 170
35. L. Ogielski, A. Skurski i K. Sylwestrówna: Obraz mikroskopowy flory bakteryjnej procesu gnilnego mięsa, zachodzącego w warunkach tlenowych 165
36. E. Prost: Badania nad zastosowaniem antybiotyków w produkcji konserw mięsnych 168
37. Fr. Czapliński: Zarodnikujące drobnoustroje tlenowe w konserwach mięsnych 171
38. I. Michalska: Praktyczne znaczenie badań nad termoodpornością szczepów bakteryjnych dla kontroli bakteriologicznej w przemyśle konserwowym 174
39. J. Jakubowska, J. Mokrzycki, K. Niemyski i Z. Bednarek: Otrzymywanie drożdży pastewnych na hydrolizatach z hydrolizy wstępnej drewna sosnowego metodą siarczanową 177
40. H. Zaorska i S. Zagrodzki: Biologiczna synteza białka z odsolonego wywaru melasowego 197
41. Z. Bednarek: Wstępne próby hodowli *Oidium* na hydrolizacie drewna sosnowego. 204
42. St. Bujak: Wykorzystanie odpadków przemysłowych do produkcji białka paszowego. 208
43. S. Zagrodzki i W. Krzysztofik: Ciągła fermentacja cytrynowa melasu przy użyciu anionitu 209
44. J. Kovats i M. Lewicka: Badania nad oczyszczaniem melasów dla celów fermentacji kwasu cytrynowego 221
45. K. Michalska: Wpływ streptomycyny na wytwarzanie kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger*. 221

str.

46. E. Kocwa: Działanie penicyliny i aureomycyny na *Saccharomyces cerevisiae, Thermobacterium cereale* i *Acetobacter rancens* 219
47. E. Kocwa: DDT jako czynnik stymulujący fermentację i wzrost drożdży 222
48. Z. Kin: Fermentacja etanolowa ługów posiarczynowych 232
49. L. Galińska i F. Goździk: Wpływ kwasu octowego na fermentację alkoholową 232
50. A. Jankun: Badania nad drożdżami występującymi na owocach krajowych 233
51. S. Lenord: Wpływ siarkowania na mikroflorę moszczów owocowych. . 233
52. K. Orłowska: Badanie bakterii octowych występujących w octowniach polskich. 233
53. A. Urbańska-Nowakowska: Wpływ drożdży browarniczych i kiełków słodowych na fermentację mlekową melasu. 226
54. F. Nowotny i W. Rzędowski: Badania nad otrzymywaniem enzymatycznych preparatów do klarowania soków owocowych i win. . . . 229
55. H. Rzędowska: Zagadnienie wtórnej fermentacji ziarna kakaowego w świetle badań własnych 234
56. B. Smyk: Badania mikrobiologiczne i biochemiczne nad racjonalizacją kiszenia — silosowania pasz 237
57. A. Szember: Mikroflora kiszonek ziemniaczanych 242
Objaśnienia do tablic 246

Содержание

стр

1. О. Саклавска-Шимона: Влияние меди на рост и углеводный метаболизм культуры *Escherichia coli* 99
2. Р. Ковалик и Е. Червинска: Фунгицидное действие четверохлоро-р-бензохинона и 2, 3-двухлоро-1,4-нафтохинона 111
3. Ю. Хорошевич: К вопросу форм „*L*" микроорганизмов 121
4. З. Дымовска и А. Фельтыновски: Лептоспиры в электронном микроскопе 125
5. К. Обойска: Разложение насыщенных и ненасыщенных углеводородов сапрофитическими микобактериями 129
6. Т. Тейссейр: Влияние стерилизации на pH среды в зависимости от ее состава 133
7. З. Курыло и И. Питек: Влияние разных условий высушивания на жизнеспособность бактерийных штаммов 139
8. М. Хорст и Р. Котельба: Лабораторный метод фиксирования и хранения бактерийных культур 142
9. Т. Ястржембски, Я. Коханьски и Ст. Ушински: Регенерация агара 145
10. С. Дегси-Брандес: Методы скорой дифференциации *Proteus* и других видов *Enterobacteriaceae* в фазе „О". 147
11. Я. Квапински и Г. Петрашкевич: Пигментообразовательная изменчивость *Pseudomonas aeruginosa* и *Serratia marcescens* под влиянием фенантреновых алкалоидов 149
12. К. Матусяк: Исследования над использованием калия *A. niger* из филиповицкого туфа 150
13. А. Люхтер: Геомикробиология в нефтяной промышленности . . . 151
14. Н. Балицка: Влияние степени влажности почвы во время обработки на ее физические свойства и микрофлору 155

стр.

15. З. Каницка, К. Кендржинска, С. Масс, Е. Петровска, Х. Томчик и З. Вольницка: Исследование воды в колодцах города Лодзи 155
16. А. Тиммлер, К. Огродовчик и З. Онько: Физикохимические и микробиологические исследования воды реки Лодки 157
17. М. Мокржицка и Г. Высочинска: Сопоставление ферментационного и фильтрационного методов для определения *E. coli* в воде при помощи фильтровальных пленок собственной продукции 159
18. Е. Червинска, И. Садурска и Д. Козловска: Актиномицеты, разрушающие старинные книги и рукописи 160
19. Л. Огельски, А. Скурски и К. Сильвестер: Микроскопическая картина бактерийной флоры гнилостного процесса мяса в аэробных условиях 165
20. Э. Прост: Применение антибиотиков в качестве бактериоцидных средств в консервной промышленности 168
21. Фр. Чаплински: Спорообразующие аэробные бактерии в мясных консервах 171
22. И. Михальска: Практическое значение исследований над термостойкостью бактерийных спор для бактериологического контроля в консервной промышленности 174
23. Я. Якубовска, Ю. Мокржицки, К. Немыски и З. Беднарек: Получение кормовых дрожжей из гидролизатов предварительного гидролиза сосновой древесины произведенного по „сернокислому методу" 177
24. Г. Заорска и С. Загродски: Биологический синтез белков из лишенной солей мелассы 197
25. З. Беднарек: Предварительные попытки выращивания *Oidium lactis* на гидролизате сосновой древесины 204
26. Ст. Буяк: Исследование пригодности промышленных отбросов для продукции белковых кормов 208
27. С. Загродски и В. Кржиштофик: Беспрерывная лимоннокислая ферментация при употреблении анионита 209
28. Я. Коватш и М. Левицка: Исследования над очищением меласс для лимоннокислой ферментации 221
29. Е. Коцва: Влияние пенициллина и ауреомицина на *Saccharomyces cerevisiae*, *Thermobacterium cereale* и *Acetobacter rancens* 219
30. Е. Коцва: Влияние Д. Д. Т. на рост и ферментацию дрожжей 222
31. З. Кин: Спиртовая ферментация сульфитных щелков 232
32. К. Орловска: Исследования над уксуснокислыми бактериями, выступающими на польских уксусных заводах 233
33. А. Урбанска-Новаковска: Влияние дрожжей и слодовых ростков на молочнокислую ферментацию мелассы 226
34. Ф. Новотны и В. Ржендовски: Пробы получания энзиматических препаратов для просветления плодовых соков и вин 229
35. Г. Ржендовска: Проблема вторичной ферментации какаовых зерен на основании собственных исследований. 234
36. Б. Смык: Микробиологические и химические исследования над рационализацией силосования кормов 237
37. А. Шембер: Микрофлора картофельных силосов 242

CONTENTS

Page

1. O. Sakławska-Szymonowa: The effect of copper on the growth and glucose metabolism in the fluid cultures of *E. coli* 99
2. R. Kowalik and E. Czerwińska: The fungicidal potency of tetrachlor-benzoquinone and of 2,3-dichlor-1,4-naphtaquinone . . 111
3. J. Horoszewicz: *L* forms in *Escherichia coli* 121
4. Z. Dymowska and A. Feltynowski: Electron microscope studies on *Leptospira* 125
5. K. Obojska: The breakdown of saturated and unsaturated hydrocarbons by saprophytic mycobacteria 129
6. T. Teisseyre: The effect of sterilisation on pH of the media. . . . 133
7. Z. Kuryło and I. Pitekówna: The effect of some factors on the survival rate of certain bacteria in freeze-drying process 139
8. M. Horst und R. Kotelba: The method of preservation of microorganisms in laboratory 142
9. T. Jastrzębski, J. Kochański and St. Uszyński: Regeneration of agar 145
10. S. Degen-Brandes: The differentiation of *Proteus* form *O* and others rods of the family *Enterobacteriaceae* 147
11. J. Kwapiński and H. Pietraszkiewicz: Variation in pigment formation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* provoked by cultivation in the presence of phenantrene alkaloids. 149
12. K. Matusiak: The utilization of potassium from „Filipowice" tuff by *Aspergillus niger* 150
13. A. Luchterowa: Geomicrobiology in the oil industry 151
14. N. Balicka: The influence of the humidity of the soil in the moment of its tillage upon the physical properties of the soil and its microflora. 155
15. Z. Kanicka, K. Kendrzeńska, S. Mass, E. Piotrowska, H. Tomczyk and Z. Wolnicka: Bacteriological examinations of the spring-water in Łódź 155
16. A. Timler, K. Ogrodowczyk and Z. Ońko: Chemical and bacteriological examination of the water in brooklet Łódka 157
17. M. Morzycka and H. Wysoczyńska: The comparison of the results obtained by determining „*coli*-index" by fermentation and gradocol-filtration-method 159
18. E. Czerwińska, I. Sadurska and D. Kozłowska: Actinomycetes damaging old manuscripts and documents 160
19. L. Ogielski, A. Skurski and K. Sylwestrówna: Bacterial flora of the superficial aerobic meat putrefaction. 165
20. E. Prost: Suitability of antibiotics for preservation of canned meat. . 168
21. Fr. Czapliński: Sporeforming aerobic bacteria in canned meat. . . 171
22. I. Michalska: The investigation on the resistance to temperature of certain bacteria and its significance for the evaluation of sterility of canned meat 221
23. J. Jakubowska, J. Mokrzycki, K. Niemyski and Z. Bednarek: Production of fodder yeast in the pine wood hydrolyzates. . 177

Page

24. H. Zaorska and S. Zagrodzki: The production of fodder yeasts from molasses residue with previous removing of salts 197
25. Z. Bednarek: Propagation of *Oidium lactis* on pine-wood hydrolyzates 204
26. St. Bujak: Utilization of industrial wastes for fodder yeast propagation 208
27. S. Zagrodzki and W. Krzysztofik: The continuous citric fermentation of molasses with application of anionic exchange agents. . . 209
28. J. Kovats and M. Lewicka: The purification of molasses for citric acid fermentation 221
29. E. Kocwa: The influence of penicillin and aureomycin upon *Saccharomyces cerevisiae*, *Thermobacterium cereale* and *Acetobacter rancens*. . 219
30. E. Kocwa: DDT as a stimulant of the growth and fermentation in yeasts 22
31. Z. Kin: Alcoholic fermentation in sulphite liquors. 232
32. K. Orłowska: The studies on the acetic acid bacteria in Polish vinegar factories 233
33. A. Urbańska-Nowakowska: The influence of brewers yeast and of malt upon the lactic acid fermentation of molasses. 226
34. F. Nowotny and W. Rzędowski: Preparation of the pectin enzyme complex for clarification of fruit juices 229
35. H. Rzędowska: The investigations on the fermentation of cacao beans 234
36. B. Smyk: Microbiological and biochemical investigations during silage preparation 237
37. A. Szember: Microflora of potato-silages 242

Prenumerata półroczna „*Acta Microbiologica Polonica*" wynosi 20 zł—, roczna 40 zł—. Wpłaty należy przekazywać na konto Państwowego Wydawnictwa Naukowego w **PKO Warszawa, Nr I—110—28504.**

Prenumeraty zgłoszone dotychczas w placówkach pocztowych lub w P.P.K. Ruch, będą wykonane w okresach, na które uiszczono przedpłaty, natomiast odnowienia prenumeraty należy dokonać przez podane wyżej konto PKO.

Pojedyncze numery są do nabycia w Księgarniach Naukowych

DOMU KSIĄŻKI

ADRESY KSIĘGARŃ NAUKOWYCH DOMU KSIĄŻKI

1. BIAŁYSTOK	RYNEK KOŚCIUSZKI 12/14	11. ŁÓDŹ	NARUTOWICZA 34
2. BYDGOSZCZ	DWORCOWA 14	12. OLSZTYN	PLAC WOLNOŚCI 2/3
3. BYTOM	STALINA 10	13. POZNAŃ	27 GRUDNIA 23
4. CZĘSTOCHOWA	AL. N. M. P. 14	14. RZESZÓW	3 MAJA 2
5. GDAŃSK-WRZESZCZ	GRUNWALDZKA 8	15. SZCZECIN	SIKORSKIEGO 7
6. GLIWICE	ZWYCIĘSTWA 31	16. TORUŃ	RYNEK STAROMIEJSKI 30
7. STALINOGRÓD	WARSZAWSKA 11	17. WARSZAWA	KRAKOWSKIE PRZEDM. 7
8. KIELCE	SIENKIEWICZA 30	18. WROCŁAW	KUŹNICZA 42
9. KRAKÓW	PODWALE 6	19. WROCŁAW	CURIE-SKŁODOWSKIEJ 39
10. LUBLIN	KRAKOWSKIE PRZEDM. 52	20. ZABRZE	WOLNOŚCI 288
		21. OPOLE	OZIMSKA 8

Cena zł 20.–